

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**POLAROGRAFICKÉ STANOVENÍ
GENOTOXICKÉHO 2-AMINO-9-FLUORENONU**

**POLAROGRAPHIC DETERMINATION
OF GENOTOXIC 2-AMINO-9-FLUORENONE**

Bakalářská práce
studijního oboru Chemie v přírodních vědách

Praha 2010

Andrea Hájková

Abstrakt bakalářské práce

Cílem bakalářské práce bylo nalézt optimální podmínky pro polarografické stanovení genotoxického 2-amino-9-fluorenonu (2-AFN), který může negativně působit na životní i pracovní prostředí. Nejprve byla pomocí UV-VIS spektrofotometrie sledována stabilita zásobního roztoku 2-AFN v methanolu a zjištěn vhodný poměr pufované vodné a methanolické fáze pro následná polarografická měření na klasické rtuťové kapající elektrodě (DME). Závislost polarografického chování 2-AFN o koncentraci $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ na změně pH analyzovaného roztoku byla měřena pomocí DC tast polarografie (DCTP) a diferenční pulsní polarografie (DPP) v rozmezí pH 1,9 až 12,8 v prostředí Brittonova-Robinsonova (BR) pufru a methanolu (9:1). Pro elektrochemicky redukovatelnou oxoskupinu na 2-AFN byl na základě pozorovaného chování navrhnut mechanismus její polarografické redukce na DME. Pro proměření koncentračních závislostí bylo vybráno optimální prostředí BR pufru o pH 4,0 – methanol (9:1) pro obě polarografické metody. Metodou DCTP na DME bylo změřeno koncentrační rozmezí 1×10^{-6} až $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ a metodou DPP na DME 1×10^{-7} až $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Dosažené meze stanovitelnosti (L_Q) činily $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ (pro DCTP na DME) a $1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ (pro DPP na DME). Pro srovnání bylo pro 2-AFN proměřeno koncentrační rozmezí 1×10^{-7} až $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ pomocí UV-VIS spektrofotometrie v methanolu a v BR pufru o pH 4,0 – methanol (9:1) obě prostředí ($L_Q \sim 1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$). Takto bylo prokázáno, že L_Q pro 2-AFN dosažené metodou DPP na DME a pomocí UV-VIS spektrofotometrie jsou za daných podmínek srovnatelné.

Abstract of Bachelor Thesis

The aim to this work was to find the optimum conditions for polarographic determination of genotoxic 2-amino-9-fluorenone (2-AFN) that can negatively affect the living and working environment. Foremost, the stability of 2-AFN stock solution in methanol was monitored using UV-VIS spectrophotometry and an optimal ratio of buffered aqueous and methanolic phase was found out for following polarographic measurements at a classical mercury dropping electrode (DME). The dependence of polarographic behavior of 2-AFN (of concentration $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) on pH of analyzed solution was measured using DC tast polarography (DCTP) and differential pulse polarography (DPP) in the pH range 1.9 – 12.8, in the medium of Britton-Robinson (BR) buffer – methanol (9:1). The mechanism of polarographic reduction of electrochemically reducible oxo group at 2-AFN has been proposed on the basis of thus observed behavior. The optimum medium of BR buffer pH 4.0 – methanol (9:1) has been chosen for both polarographic techniques. The concentration range from 1×10^{-6} to $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ was measured using DCTP at DME and from 1×10^{-7} to $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ using DPP at DME. Reached limits of quantification (L_{QS}) were $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ and $1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ for DCTP at DME and DPP at DME, respectively. For comparison, the range of 2-AFN concentrations from 1×10^{-7} to $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ was measured using UV-VIS spectrophotometry in methanol and in BR buffer pH 4.0 – methanol (9:1) (for both media, $L_Q \sim 1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$). It was thus proven that L_{QS} of 2-AFN reached using DPP at DME and using UV-VIS spectrophotometry are comparable under given conditions.

Předmětová hesla: analytická chemie
elektrochemie
polarografie
deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků

Klíčová slova: 2-amino-9-fluorenol
DC test polarografie
diferenční pulsní polarografie
klasická rtuťová kapající elektroda
UV-VIS absorpční spektrofotometrie

Objective Words: Analytical Chemistry
Electrochemistry
Polarography
Derivatives of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Key Words: 2-Amino-9-fluorenone
DC Test Polarography
Differential Pulse Polarography
Classical Mercury Dropping Electrode
UV-VIS Absorption Spectrophotometry

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumných záměrů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekty MSM 0021620857, LC 06035 a RP 14/63 a Grantové agentury Univerzity Karlovy v Praze (projekt SVV 261204 a z těchto projektů byla také finančně podporována.

Prohlášení

Tato bakalářská práce byla vypracována v rámci širšího projektu řešeného na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2009 – 2010, který se věnuje studiu elektrochemického chování biologicky aktivních organických látek, které jsou významné z hlediska ochrany životního prostředí, farmacie a toxikologie.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Mgr. Vlastimila Vyskočila, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 30. května 2010.

.....
podpis

Poděkování

Nejprve bych ráda velmi poděkovala svému školiteli Mgr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, pomoc a cenné připomínky k mé práci. Dále chci poděkovat prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc. a členům Katedry analytické chemie za ochotu a pomoc.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům, že mě podporují a umožňují mi studium na vysoké škole.

Děkuji za podporu.

Obsah

1. Teoretický úvod

1.1 Cíl práce	8
1.2 Studovaná látka	8
1.3 Výskyt, vlastnosti, využití a biologické účinky polycyklických aromatických uhlovodíků a jejich derivátů s přihlédnutím k 2-amino-9-fluorenonu	9
1.4 Využití 2-amino-9-fluorenonu v analytické chemii	11
1.5 Použitá pracovní elektroda	12
1.6 Použité metody polarografie	13

2. Experimentální část

2.1 Reagencie	14
2.2 Aparatura	14
2.3 Rtuťová kapající elektroda a její parametry	15
2.4 Stálost zásobního roztoku	15
2.5 Pracovní postupy	19
2.6 Optimální složení základního elektrolytu	20

3. Polarografické stanovení 2-amino-9-fluorenonu

3.1 DC tast polarografie	24
3.1.1 Vliv pH na polarografické chování 2-amino-9-fluorenonu	24
3.1.2. Redukční mechanismus reakce probíhající na rtuťové kapající elektrodě	27
3.1.2.1 Redukční mechanismus v kyselém prostředí	28
3.1.2.2 Redukční mechanismus v neutrálním a zásaditém prostředí	28
3.1.3 Koncentrační závislost odezvy 2-amino-9-fluorenonu	30
3.2 Diferenční pulsní polarografie	33
3.2.1 Vliv pH na polarografické chování 2-amino-9-fluorenonu	33
3.2.2 Koncentrační závislost odezvy 2-amino-9-fluorenonu	30

4. UV-VIS spektrofotometrické stanovení 2-amino-9-fluorenonu

4.1 Koncentrační závislost v methanolu	44
4.2 Koncentrační závislost v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1)	46

5. Závěr

50

6. Literatura

51

Seznam použitých zkratk a symbolů

2-AFN	2-amino-9-fluorenon
A	absorbance [AU]
BR pufr	Brittonův - Robinsonův pufr
c	molární koncentrace [mol dm^{-3}]
C.A.S.	Chemical Abstract Service
DME	klasická rtuťová kapající elektroda
DCTP	DC tast polarografie
DPP	diferenční pulsní polarografie
$E_{1/2}$	půlvlnový potenciál [mV]
E_p	potenciál píku [mV]
h	výška rtuťového rezervoáru [cm]
I_{lim}	limitní proud [nA]
I_p	proud píku [nA]
L_Q	mez stanovitelnosti [mol dm^{-3}]
M_r	relativní molekulová hmotnost
n	počet měření
P	plocha píku [nA V]
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových ionů
pH^*	pH směsného vodně-methanolického prostředí
R^2	koeficient determinace
s_r	relativní směrodatná odchylka [%]
t	čas [s]
t_k	doba kapky DME [s]
UV-VIS	spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti
β -CDX	β -cyklodextrin
ε_λ	molární absorpční koeficient [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
λ	vlnová délka [nm]
λ_{max}	vlnová délka absorpčního maxima [nm]

1. Teoretický úvod

1.1 Cíl práce

S neustálým rozvojem průmyslu stoupá znečištění životního prostředí toxickými látkami, proto je také velmi důležitý jejich výzkum a monitorování, k němuž je zapotřebí vyvíjet citlivé metody stanovení těchto látek.

Cílem bakalářské práce bylo nalezení optimálních podmínek pro stanovení genotoxického 2-amino-9-fluorenonu (2-AFN) na klasické rtuťové kapající elektrodě (DME). S využitím metody DC tast polarografie (DCTP) a diferenční pulsní polarografie (DPP) dosáhnout co nejnižší meze stanovitelnosti (L_Q). Porovnání L_Q získané z polarografického měření s určením 2-AFN pomocí UV-VIS spektrofotometrie.

1.2 Studovaná látka

Studovanou látkou je 2-AFN. Jedná se o biologicky aktivní látku, která patří mezi deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků. Látka je nebezpečná a má genotoxické účinky, proto bychom s látkou měli zacházet velmi opatrně, zamezit styku s kůží, očima a zabránit jejímu rozptýlení [1].

2-AFN je červenohnědý jemný prášek [1,2], ve vodě nerozpustný, rozpustný v organických rozpouštědlech, hlavně v alkoholech a etherech [2]. Chemické, fyzikální a toxikologické vlastnosti nebyly doposud zcela prozkoumány. Látka je stabilní při skladování v důkladně uzavřené nádobce na suchém a dobře větraném místě [1].

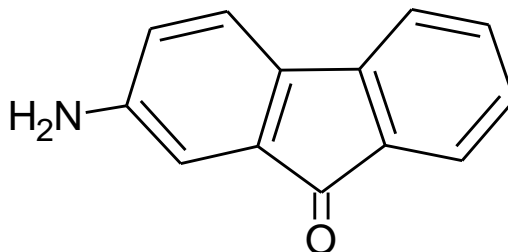
C.A.S. Name: 2-Aminofluoren-9-one

C.A.S. Registry Number: 3096-57-9

Sumární vzorec: $C_{13}H_9NO$

Molekulová hmotnost: $195,22 \text{ g mol}^{-1}$

Bod tání: $157 - 160 \text{ }^{\circ}\text{C}$



Obr. 1 Strukturní vzorec 2-AFN

1.3 Výskyt, vlastnosti, využití a biologické účinky polycyklických aromatických uhlovodíků a jejich derivátů, s přihlédnutím k 2-amino-9-fluorenonu

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) mají dvě nebo více aromatických jader v lineárním, angulárním nebo klastrovém uspořádání. Zahrnují také alkyl-substituované a funkční deriváty. Substituce na jádře ovlivňuje genotoxické vlastnosti sloučeniny. Nejčastěji se v životním a pracovním prostředí vyskytují nitro-, halogen-, amino-, oxo-, sulfo- a hydroxyderiváty [3]. PAU patří mezi všudypřítomné [4] a velmi nebezpečné sloučeniny pro žijící organismy i následné generace [5]. Řada z nich jsou potenciálními karcinogeny, mutageny a mnohé mají i toxické vlastnosti [3,4]. Mutagenita a karcinogenita závisí na struktuře látky a stoupá s rostoucím počtem jader [3].

PAU se vyskytují ve všech biotických i abiotických složkách [3]. Jsou velkým problémem životního prostředí v mnoha průmyslových zemích [6,4]. Nejsou chemicky syntetizovány, ale jsou izolovány z kamenouhelného dehtu nebo při pyrolýze fosilních paliv [7].

Jsou to stabilní sloučeniny a mají tendenci se kumulovat v živých organismech. V ovzduší se PAU vyskytují hlavně vázány na povrch atmosférických tuhých částic a jsou indikátory antropogenních zásahů do čistých oblastí. Ve vodě závisí výskyt PAU na rozpustnosti, která ovlivňuje jejich distribuci. Hydrofobní charakter způsobí adsorpci na organických částech. Odumřením a rozkladem rostlin a živočichů se PAU dostávají do půdy, kde je dále metabolizují půdní mikroorganismy [3]. PAU nemají tendenci se šířit prostřednictvím půdy rovnoměrně, proto vzorek pro analýzu musí být důkladně odebrán [6].

Fyzikálně-chemické vlastnosti PAU jsou ovlivněny molekulovou hmotností sloučeniny. Dokonalá konjugace umožňuje jejich stanovení pomocí absorpční spektrofotometrie [3]. Mezi další vlastnosti patří jejich tepelná odolnost, vodivost či odolnost proti korozi. [7]. Jejich reaktivita závisí na počtu a uspořádání kondenzovaných jader [5]. Jsou to pevné látky s vysokým bodem tání a varu, nízkým tlakem par, velmi nízkou rozpustností ve vodě, která se snižuje se zvyšující se molekulovou hmotností. PAU jsou vysoce lipofilní a snadno rozpustné v organických rozpouštědlech. Se zvyšující se molekulovou hmotností se zvyšuje odolnost vůči oxidaci a redukci [3,7]. Nejčastější použití je v oblasti léčiv, zemědělských produktů, fotografických produktů, termosetů a v chemickém průmyslu [7].

Nejaktuálnější problémem je omezení použití PAU v průmyslu a tím minimalizování nebezpečí pro lidské zdraví a životní prostředí [4].

Fluoren je členem PAU. Dvě benzenová jádra jsou připojena k cyklopentanovému kruhu. Emituje fluorescenční záření fialové barvy. Není syntetizován, ale komerčně se získává z olejové frakce z černouhelného dehtu. Pro svoji nerozpustnost ve vodě a bod tání 116 – 117 °C se fluoren využívá v metalurgii jako vhodný ligand v katalyzátorech. Používá se při tvorbě polyradikálů, pro výrobu pryskyřic a při výrobě léků proti malárii a dalších farmaceutických výrobků. Fluoren a jeho sloučeniny jsou základními materiály pro barviva a optické zjasňující prostředky. Mají užitečné vlastnosti, jako jsou světelná a teplotní citlivost, tepelná odolnost, vodivost a odolnost proti korozi. Jsou používány v chemii tekutých krystalů, luminiscenční chemii, spektrofotometrické analýze, molekulární chemii a v chemii organokovových komplexů [7].

K oxidaci fluorenu dochází nejnáze v nejreaktivnější pozici 9 [7]. Vzniklý 9-fluorenon má žlutou barvu [8] a je mírným oxidačním činidlem. Sloučenina se používá v organických solárních článcích a zobrazovacích zařízeních [7]. 9-Fluorenony a alkyl-9-fluorenony jsou přítomny v motorové naftě a jsou komponenty výfukových plynů vznětových motorů [9].

2-AFN je jedním z aminoderivátů 9-fluorenonu, které se vyskytují v životním prostředí. Má karbonylovou a aminoskupinu, které mohou tvořit vodíkové vazby s protickými a aprotickými rozpouštědly. Používá se jako fluorescenční sonda pro vyšetřování biologického prostředí [10]. Během výroby a čištění plynu v plynárnách byl získán velmi nebezpečný odpad, ve kterém byl hmotnostní spektroskopii nalezen také 2-AFN. Ten se stal součástí silně znečištěné vody plynových zařízení a vysokou zátěží znečištění podzemních vod. Odebrané vzorky vody z těchto kontaminovaných míst často obsahují velké množství různých aromatických a heterocyklických sloučenin [11]. 2-AFN byl také spolu s emisemi oxidů dusíku, respirabilními částicemi a mnoha PAU nalezen ve výfukových plynech vznětových motorů. Použitím keramického filtru bylo dosaženo snížení hladiny částic a souvisejících ekologických problémů [9].

Obecně jsou aromatické aminy nebezpečné látky mající mutagenní a karcinogenní potenciál [12]. Průzkum karcinogenity 2-AFN byl zkoumán pomocí reakce hepatocytů u potkanů. Reakci poskytl 2-aminofluoren, který je hepatokarcinogenem, ale žádná reakce nebyla pozorována po podání 2-nitrofluorenu, 2-AFN, fluorenu nebo anthracenu [13].

Z 2-AFN lze připravit žlutý 2-azido-9-fluorenon oxim, který při ozáření světlem reaguje s DNA. Výzkum ukázal, že 2-azido-9-fluorenon oxim v kvasinkách je mutagenní pouze při ozáření, zatímco neozářené buňky zůstaly nezměněny [12]. 2-AFN byl také použit jako amin pro přípravu Schiffových basí, které poskytují široké spektrum možností léčení.

Studovány byly vhodné struktury a vlastnosti s cílem připravit víceúčinné protirakovinné činidlo [14].

1.4 Využití 2-amino-9-fluorenonu v analytické chemii

Spektrofotometrické využití 2-amino-9-fluorenonu při fluorimetrické studii [10]

Byla popsána molekulární interakce β -CDX a 2-AFN vlivem UV-záření. Fluorescenční měření probíhalo ve vodném roztoku při různých hodnotách pH. Byly studovány účinky kyselosti v základním a excitovaném stavu rovnováhy mezi neutrální a kationovou formou 2-AFN ve vodě a v prostředí β -CDX. Na základě změny fluorescenčního spektra a doby života 2-AFN různým přidavkem β -CDX bylo zjištěno, že nesubstituovaná část 2-AFN je zapouzdřena v hydrofobní dutině β -CDX. Ve vodě se vytvoří hydroxylové skupiny na vnějším povrchu prstence a vznikne hydrofobní dutina, která tvoří komplexy. Přídavek β -CDX posouvá absorpční maximum při λ_{\max} ke kladnějším hodnotám λ s malým a pravidelným nárůstem absorbance. To může být způsobeno zvýšenou rozpustností vznikajícího 2-AFN- β -CDX komplexu. Fluorescenční emisní spektrum 2-AFN s různou koncentrací β -CDX má ve vodě dvě emisní maxima ($\lambda_{\max} = 354 \text{ nm}$ a $\lambda_{\max} = 474 \text{ nm}$). Po začlenění 2-AFN do hydrofobní dutiny β -CDX poklesne druhé maximum a zvýší se první maximum. Záporná hodnota Gibbsovy energie ($-17,9 \text{ kJ mol}^{-1}$) pak určuje, že začlenění 2-AFN do β -CDX probíhá zcela spontánně. Dále byla analyzována fluorescenční spektra 2-AFN v cyklohexanu, dioxanu, acetonitrilu a methanolu. V cyklohexanu pozorujeme jen jedno maximum ($\lambda_{\max} = 344 \text{ nm}$). Druhé maximum roste v dalších rozpouštědlech s rostoucí polarizací [10].

Amino-9-fluorenony jako testovací látky při studiu rozlišení ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii [15]

Aromatické aminy byly použity jako testovací látky při studiu chromatografického rozlišení v kolonách s navázanými měďnatými iony. Přítomnost Cu^{2+} je zásadní pro separaci a umožňuje pomocí změny množství mědi v koloně (při optimální koncentraci methanolu v mobilní fázi) rychlé oddělení aromatických aminů. Cu^{2+} byly koordinovány dvěma ligandy – dithiokarbamátem a diketonem, které jsou chemicky vázány na silikagel. Kovové kationy byly používány ve výměnné chromatografii pro dosažení selektivnější separace. Bez mědi je 2-AFN eluován před 4-amino-9-fluorenonem a s Cu^{2+} je 2-amino izomer zadržován delší dobu než 4-amino izomer. Interakce mezi Cu^{2+} a 2-amino izomerem je silnější než interakce s 4-amino izomerem. Kunzru a Frei využili pro oddělení některých

aromatických aminů Cd^{2+} a Yasuda oddělil aromatické aminy pomocí tenkovrstvé chromatografie na deskách nabitých kovovými iony [15].

Polarografické chování 9-fluorenonu a 2-amino-9-fluorenonu

Redukce ketonů stejně jako mnoho dalších organických sloučenin závisí na pH roztoku, prostředí, koncentraci elektrolytu a koncentraci organické složky [16,17]. Ashworth se zajímal o různé vlastnosti, které ovlivňují mimo jiné i redukci 9-fluorenonu. Například o závislost koncentrace či druhu kationu na pozici a výšce druhé vlny, kdy se zvyšující se koncentrací hydroxidu půlvalnový potenciál druhé vlny 9-fluorenonu posouvá ke kladnějším hodnotám. Výška a poloha vlny závisí také na teplotě roztoku hydroxidu. S rostoucí teplotou roste výška vlny a při nižších teplotách se půlvalnový potenciál posouvá k zápornějším hodnotám [16].

Polarografická redukce 9-fluorenonu byla studována také v roztocích o různých koncentracích ethanolu a při různých pH hodnotách. 9-Fluorenon vykazuje nejsilnější tendenci k formě dvojité vlny. Třetí vlna 9-fluorenonu byla pozorována ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů [17]. 9-Fluorenon byl redukován ve dvou krocích v rozmezí pH od 1,8 do 12,0 a byly pozorovány dvě vlny přibližně stejné výšky [18].

Při studiu vlivu amino-, hydroxylamino- a nitroskupin navázaných na aromatickém jádře na redukci oxoskupiny a počet vln byl 2-AFN rozpuštěn v acetonu a redukován v jediném dvouelektronovém kroku v citrátovo-fosfátovém pufru o pH 1,3 až 12,0. Při pH 12,0 došlo k rozdělení vlny na dva jednoelektronové kroky [19].

1.5 Použitá pracovní elektroda

DME je skleněná kapilára o vnitřním průměru 0,05 až 0,08 mm, která je spojena plastovou hadicí s rozšířeným rezervoárem rtuti. Rtuť odkapává od ústí skleněné kapiláry. Kapilára je charakterizována dobou kapky, která by se měla pohybovat mezi 2 až 5 s. Doba kapky závisí na výšce rezervoáru, na povrchovém napětí rtuti a mění se s potenciálem elektrody. Průtoková rychlost rtuti je dána vnitřním průměrem kapiláry, její délkou a měla by být 1,5 až 4,0 mg s^{-1} . DME je vhodná pro stanovení látek katodickou redukcí při negativních potenciálech [20,21].

Výhody rtuťové kapající elektrody

Povrch rtuti je homogenní, atomicky hladký a lze ho snadno obnovovat. Pravidelné odkapávání čisté rtuti zajišťuje, že elektrochemický proces probíhá na stále novém, čistém povrchu, prakticky nezávislém na předchozí polarizaci, proto jsou výsledky dokonale

reprodukovatelné. Rtuť se vyznačuje největším přepětím vodíku, proto můžeme pracovat v neutrálním prostředí při velmi negativních potenciálech. Z neutrálních roztoků mohou být vyloučeny dokonce alkalické kovy snadněji než vodík. Při elektrolýze se vylučuje jen nepatrné množství depolarizátoru, proto polarografické křivky mohou být libovolně opakovány, aniž se podstatně mění složení roztoku. DME je neporušitelná oxidačně-redukční elektroda, která vlivem stále obnovovaného povrchu nepodléhá jevům pasivity jako tuhé elektrody při voltametii. Malé rozměry DME umožní měření i ve velmi malých objemech (0,01 až 0,005 ml), což má velký význam pro mikroanalýzu [20,21,22].

Nevýhody rtuťové kapající elektrody

Nevýhodou DME je omezené použití v anodické oblasti [20,22], ve které dochází k oxidaci rtuti. Interval využitelného potenciálu DME je podle složení roztoku od +0,4 V až do -2,6 V. Nad +0,4 V se anodicky rozpouští rtuť a za -2,6 V dojde k rozpadu rozpouštědla [20,21]. Další nevýhodou DME je toxicita kovové rtuti [22].

1.6 Použité metody polarografie

DC tast polarografie

Tato metoda patří mezi stacionární metody. Potenciál vkládaný na pracovní elektrodu se s časem lineárně mění. Analyt se při určitém potenciálu oxidační nebo redukuje, tím dojde k depolarizaci a roztokem začne protékat proud. Velikost proudu je mírou koncentrace analytu. Přítomnost analytu v této metodě se objeví ve formě polarografické vlny. Pokud zreaguje veškerá látka u pracovní elektrody, prochází jí limitní difúzní proud, který je kvantitativní charakteristikou analytu a půlvlnový potenciál odpovídá poloviční hodnotě limitního difúzního proudu. $E_{1/2}$ je kvalitativní charakteristikou analytu. Mez stanovitelnosti látky touto metodou je $10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ [20].

Diferenční pulsní polarografie

Tato pulsní metoda má v současné době velký význam pro elektroanalytickou chemii a patří mezi nestacionární techniku. Na potenciál je vložen napěťový puls o amplitudě 10 až 100 mV. Závislost rozdílu proudu před vložením pulsu a po jeho konci na potenciálu má tvar píku. Poloha píku je kvalitou analytu a výška píku závisí na koncentraci. Mez stanovitelnosti látky touto metodou je $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ [20].

2. Experimentální část

2.1 Reagencie

Studovanou látkou byl 2-AFN v 99% čistotě od firmy Sigma-Aldrich, Praha. Zásobní roztok o koncentraci 1×10^{-3} mol dm^{-3} byl připraven navážením 0,04886 g 2-AFN a kvantitativním převedením methanolem (p.a., Merck, SRN) do 500ml odměrné baňky. Aby se látka zcela rozpustila, byl použit ultrazvuk. Po 5 minutách rozpouštění látky pomocí ultrazvuku byla 500ml odměrná baňka doplněna methanolem po rysku. Vzniklý červenooranžový zásobní roztok byl uchováván zabalený v alobalu ve tmě za laboratorní teploty. Roztoky 2-AFN s nižšími koncentracemi byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku methanolem.

Zásaditá složka Brittonova-Robinsonova (BR) pufru byla připravena rozpuštěním 8 g pevného hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice) v 1 litru deionizované vody. Vzniklý 0,2 mol dm^{-3} roztok hydroxidu sodného byl uchováván ve skleněné tmavé zásobní lahvi. Kyselá složka BR pufru byla připravena smísením 5,39 ml 85% kyseliny fosforečné (p.a., Lach-Ner, Neratovice), 4,54 ml 99,8% octové kyseliny (p.a., Lach-Ner, Neratovice), rozpuštěním 5,49 g kyseliny borité (p.a., Lachema, Brno) a doplněním deionizovanou vodou na objem 2 litrů. Vzniklý roztok o koncentraci 0,04 mol dm^{-3} byl uchováván ve skleněné tmavé zásobní lahvi. BR pufr o příslušném pH byl pak připraven smísením jeho zásadité a kyselé složky. Dalšími použitými chemikáliemi byly kyselina chlorovodíková (p.a., Lachema, Brno) a deionizovaná voda (Millipore Milli-Q plus system, Millipore, USA).

2.2 Aparatura

Při polarografických stanoveních byla použita sestava Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 5.1 (oboje Polaro-Sensors, Praha). Software pracoval v operačním systému Windows XP (Microsoft Corporation, USA). Jednotlivá měření byla prováděna ve tříelektrodovém zapojení, kde byla jako referentní elektroda použita argentochloridová elektroda (1 mol dm^{-3} KCl) typu RAE 113 (Monokrystaly, Turnov) a jako pomocná elektroda platinová drátková elektroda. Pracovní elektrodou byla DME. Za použití techniky DCTP a DPP byla použita rychlost polarizace 4 mV s^{-1} a elektronicky řízená doba kapky 1 s. Při pulsní technice DPP byly na elektrody vkládány pulsy o šířce 100 ms a modulační amplitudě -50 mV .

Spektrofotometrická měření byla prováděna na přístroji HP 8453 Diode Array Spectrophotometer (Hewlett-Packard, Nizozemí) s ovládacím programem UV-Visible ChemStation (ver. 9.01) v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 cm a 1,0 mm.

Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 3510 (Jenway, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005). Přístroj byl kalibrován pomocí standardních kalibračních pufrů.

2.3 Rtuťová kapající elektroda a její parametry

Při určité výšce rezervoáru h byla měřena doba kapky t_k při vloženém nulovém napětí proti argentochloridové elektrodě ($1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KCl}$). Kapilára byla ponořena do roztoku $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ KCl}$ a byl zaznamenáván počet kapek za 60 s při jednotlivých výškách rezervoáru rtuti.

Průtoková rychlost rtuti m byla určena ponořením ústí kapiláry do předem zvážené nádoby s malým množstvím rtuti po dobu 300 s při jednotlivých výškách rezervoáru rtuti. Nádobka se rtutí byla znovu zvážena a z rozdílu hmotností byla vypočtena hmotnost rtuti prošlé za 1 s. Naměřené a vypočítané parametry DME jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

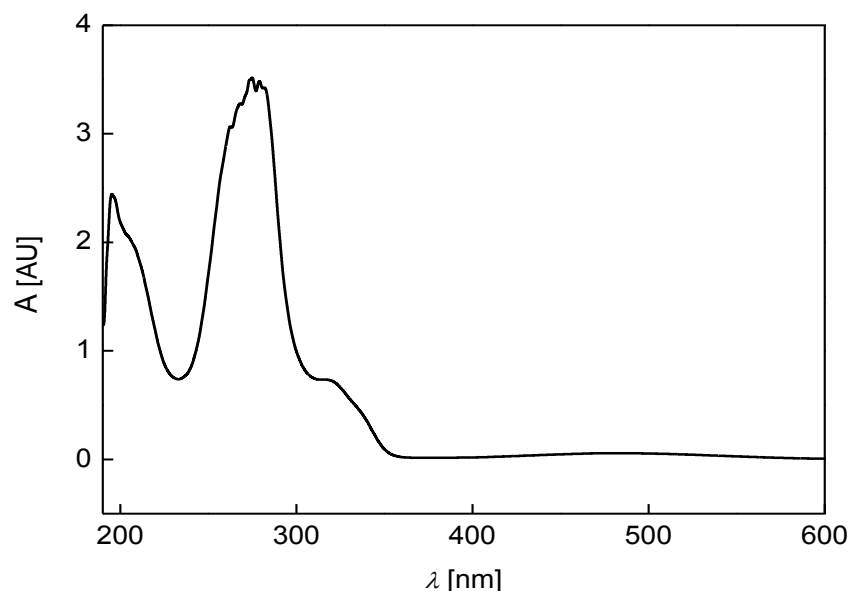
Naměřené a vypočítané parametry DME

$h \text{ [cm]}$	25	36	49	64	81
$t_k \text{ [s]}$	11,2	7,9	5,8	4,5	3,4
$m \text{ [mg s}^{-1}\text{]}$	0,65	0,96	1,29	1,69	2,22

Z výsledků měření byla zvolena nejvhodnější výška rezervoáru 81 cm, protože doba kapky byla v rozmezí 2 až 5 sekund a průtoková rychlost rtuti 1,5 až $4,0 \text{ mg s}^{-1}$ [20].

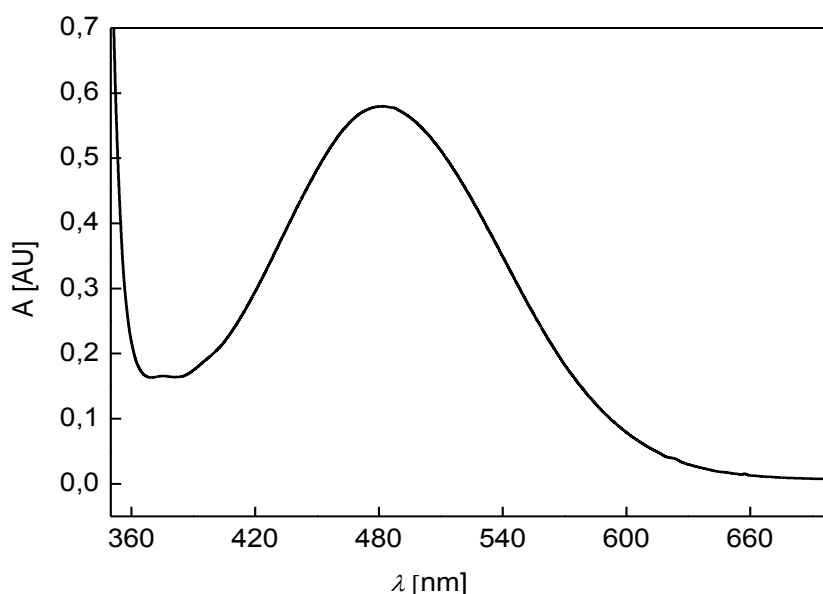
2.4 Stálost zásobního roztoku 2-amino-9-fluorenonu

Stálost zásobního roztoku 2-AFN o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ byla měřena UV-VIS spektrofotometricky v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1,0 mm proti methanolu (viz obr. 2). Za těchto podmínek vykazovalo maximum absorpčního pásu kolem vlnové délky 280 nm značný šum a příliš vysokou hodnotu absorbance, a nebylo tedy možné toto maximum pro sledování stability zásobního roztoku 2-AFN použít.



Obr. 2 Absorpční spektrum 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 1,0 mm proti methanolu.

Proto byla absorbance zásobního roztoku 2-AFN o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ změřena v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 1,0 cm proti methanolu (viz obr. 3), kde bylo možné vyhodnotit absorpční maximum při $\lambda_{\text{max}} = 483 \text{ nm}$ a $\varepsilon_{\lambda} = 579 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Vlnová délka toho maxima se nachází ve VIS oblasti a způsobuje barevnost látky. Oranžová barva roztoku 2-AFN odpovídá doplňkové modré barvě, která je roztokem absorbována. Měření stálosti roztoku 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 1,0 cm proti methanolu probíhalo po dobu 85 dní a výsledky měření jsou zaznamenány v tabulce 2.



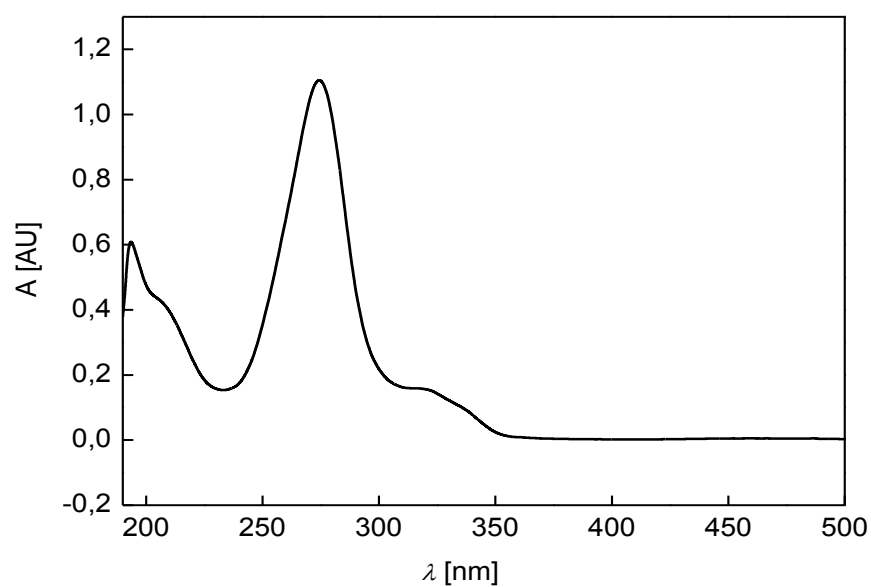
Obr. 3 Absorpční spektrum 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 1,0 cm proti methanolu.

Tabulka 2

Spektrofotometrické určení stálosti zásobního roztoku 2-AFN o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ při $\lambda_{\text{max}} = 483 \text{ nm}$ proti methanolu v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 1,0 cm. Číselné hodnoty udávají relativní hodnotu absorbance v % proti hodnotě absorbance čerstvě připraveného roztoku.

Den měření	A	Procentuální stabilita
	[AU]	[%]
1	0,579	100,0
2	0,575	99,3
3	0,580	100,2
4	0,577	99,7
5	0,574	99,1
8	0,585	101,0
15	0,584	100,9
22	0,583	100,7
36	0,592	102,2
43	0,590	101,9
57	0,588	101,6
85	0,593	102,4

Pro PAU je důležitá absorbance v UV oblasti, ve které vykazují silnou absorpci díky své dokonalé konjugaci [3]. Zředěním zásobního roztoku 2-AFN methanolem byl připraven roztok o koncentraci $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Tento roztok měl absorbanci v UV oblasti kolem 1 AU. Byla změřena stálost zředěného roztoku 2-AFN o koncentraci $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 1,0 mm proti methanolu (viz obr. 4). Absorpční maximum bylo při $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$ a $\varepsilon_{\lambda} = 5,5 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Měření stálosti roztoku 2-AFN ($c = 2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 1,0 mm proti methanolu probíhalo také po dobu 85 dní a výsledky měření stálosti zředěného zásobního roztoku 2-AFN ($c = 2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) jsou zaznamenány v tabulce 3.



Obr. 4 Absorpční spektrum 2-AFN ($c = 2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 1,0 mm proti methanolu.

Tabulka 3

Spektrofotometrické určení stálosti zředěného zásobního roztoku 2-AFN o koncentraci $2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ při $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$ proti methanolu v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 1,0 mm. Číselné hodnoty udávají relativní hodnotu absorbance v % proti hodnotě absorbance čerstvě připraveného roztoku.

Den měření	A [AU]	Procentuální stabilita [%]
1	1,106	100,0
2	1,102	99,6
3	1,104	99,8
4	1,100	99,5
5	1,106	100,0
8	1,111	100,5
15	1,140	103,1
22	1,123	101,5
36	1,166	105,4
43	1,108	100,2
57	1,120	101,3
85	1,125	101,7

Z naměřených hodnot absorbancí lze vyvodit, že během 85 dnů nedošlo k výraznému poklesu koncentrace 2-AFN, a lze tedy zásobní roztok 2-AFN při uchovávání ve tmě označit jako dostatečně stálý.

2.5 Pracovní postupy

Pro měření polarografického chování 2-AFN v závislosti na pH byl nejprve připraven BR pufr o určitém pH smícháním odpovídajících objemů zásadité a kyselé složky BR pufru. Do 10ml odměrné baňky byl odpipetován 1 ml methanolu a odměrná baňka byla doplněna BR puftrem o příslušném pH po rysku. Prostředí o hodnotě pH 1,0 bylo vytvořeno nahrazením

BR pufru zředěným roztokem $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyseliny chlorovodíkové. BR pufr a methanol v poměru 9:1 tvořil základní elektrolyt. Vzorek byl vytvořen nahrazením 1 ml methanolu 1 ml zásobního roztoku 2-AFN o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Při měření polarografických odezev 2-AFN v závislosti na koncentraci za optimálních podmínek byly připravovány roztoky 2-AFN tak, že do 10ml odměrné baňky bylo odpipetováno vhodné množství zásobního roztoku 2-AFN o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ a přidán methanol na objem 1 ml a doplněn pufrům o příslušném pH po rysku na 10 ml.

Vzorek byl přelit do polarografické nádoby a upevněn do aparatury. Probubláním dusíkem po dobu 5 minut byl roztok zbaven přítomného kyslíku. Před vstupem dusíku do polarografické nádoby byla zařazena promývačka obsahující směs deionizované vody a methanolu v objemovém poměru 9:1. Následný záznam polarografické křivky byl proveden metodou DCTP a DPP třikrát pro základní elektrolyt i vzorek roztoku 2-AFN. Před každým měřením další křivky bylo vhodné roztok znovu probublat dusíkem alespoň po dobu 30 sekund.

Výška vlny při DCTP byla měřena jako vzdálenost přímky vzniklé prodloužením lineární části polarogramu před nástupem vlny a přímky reprezentující dosaženou úroveň limitního proudu. Výška píku při DPP byla měřena od spojnice minim po jeho stranách.

Při měření spektrofotometrických křivek 2-AFN byly připraveny v prvním případě roztoky o požadovaných koncentracích do 10ml odměrných baněk zředěním zásobního roztoku 2-AFN (o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) methanolem a slepým vzorkem byl čistý methanol. V druhém případě byly připraveny roztoky stejným způsobem jako pro polarografické měření a slepým vzorkem byl 1 ml methanolu doplněný BR pufrům o optimálním pH pro polarografická měření koncentračních závislostí (BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1); viz kapitola 3.1.3). Křivky byly měřeny třikrát v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 1,0 cm.

U kalibračních přímek byly sestrojeny konfidenční a predikční pásy na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ [23]. Mez stanovitelnosti L_Q byla vypočtena jako desetinásobek směrodatné odchylky deseti měření sledované látky o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky [24].

Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty. K provádění potřebných výpočtů a tvorbě grafů uvedených v této práci bylo použito programů OriginPro 8 (OriginLab Corporation, USA) a Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA).

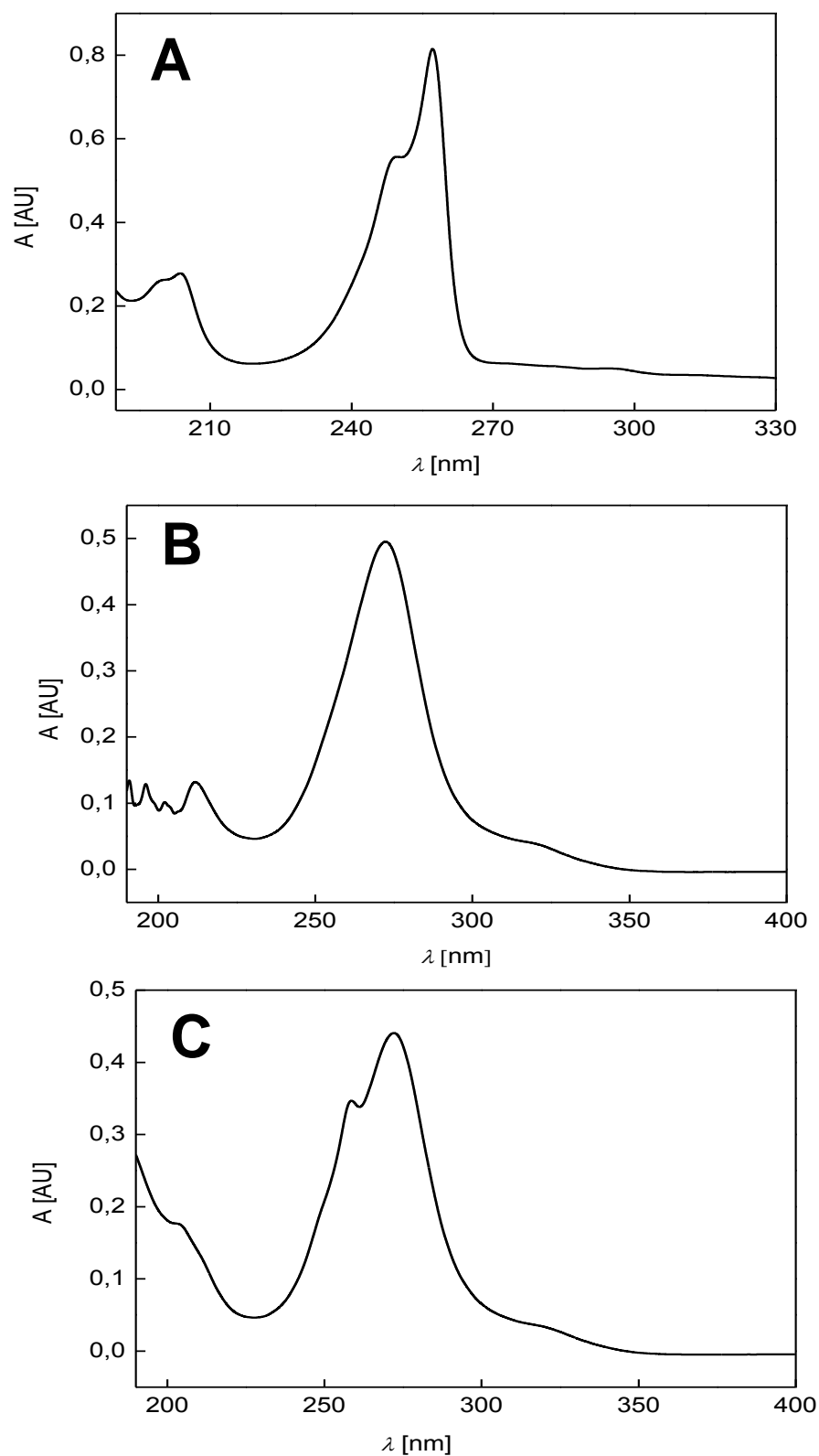
2.6 Optimalizace složení základního elektrolytu

Studovaná látka 2-AFN je rozpustná ve vodě pouze v nízkých koncentracích [2], proto byl 2-AFN rozpuštěn v methanolu, ve kterém se rozpouští lépe. Protože práce s organickými rozpouštědly je obtížnější než s vodným z hlediska čistoty organického rozpouštědla, ceny, toxicity, těkavosti a problému likvidace, byla snaha co nejvíce omezit použití methanolu při polarografickém měření. Byla provedena optimalizace poměru methanolu a BR pufru.

Do třech 10ml odměrných baněk byly připraveny roztoky methanolu a kyselé složky BR pufru o pH 1,9 v objemových poměrech 1:9, 3:7, 1:1. Stejný postup byl použit pro přípravu roztoků zásadité složky BR pufru o pH 12,8. Tyto roztoky tvořily slepé vzorky pro UV-VIS spektrofotometrická měření.

Do další 10ml odměrné baňky byl připraven roztok, který obsahoval 1 ml zásobního roztoku 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) a kyselou složku BR pufru o pH 1,9 v poměru 1:9. Do druhé 10ml odměrné baňky byl připraven roztok 1 ml zásobního roztoku 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), 2 ml methanolu a kyselé složky BR pufru o pH 1,9 v poměru 3:7. Do třetí 10ml odměrné baňky byl připraven roztok 1 ml zásobního roztoku 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$), 4 ml methanolu a kyselé složky BR pufru o pH 1,9 v poměru 1:1. Do dalších třech 10ml odměrných baněk byly připraveny stejné roztoky se zásaditou složkou BR pufru o pH 12,8. Výsledná koncentrace 2-AFN ve vzniklých roztocích pro spektrofotometrické měření činila $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Na spektrofotometru byla měřena změna absorbance s časem po dobu 13 minut (viz obr. 5). Naměřená data jsou uvedena v tabulce 4.

Po nalezení optimálního prostředí pro polarografická měření koncentračních závislostí (BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1); viz kapitola 3.1.3) bylo provedeno výše uvedeným způsobem obdobné UV-VIS spektrofotometrické měření i pro toto prostředí. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 2. Roztok 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) pro prostředí kyselé složky BR pufru o pH 1,9 – methanol (9:1) vykazoval absorbanci o hodnotě $(0,821 \pm 0,012) \text{ AU}$, $s_r = 0,30 \%$ ($n = 14$), pro prostředí zásadité složky BR pufru o pH 12,8 – methanol (9:1) byla absorbance $(0,499 \pm 0,007) \text{ AU}$, $s_r = 0,29 \%$ ($n = 14$) a pro prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1) měla absorbance hodnotu $(0,436 \pm 0,007) \text{ AU}$, $s_r = 0,33 \%$ ($n = 14$). Protože ani v jednom případě nedošlo k významnému poklesu absorbance, a tedy nedošlo k vysrážení látky z vodně-methanolického prostředí, byl zvolen poměr s nejnižším obsahem methanolu, tj. 10 %, pro přípravu základních elektrolytů pro následná polarografická měření.



Obr. 5 Absorpční spektrum roztoku 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}) v prostředí methanol – kyselá složka BR pufru o pH 1,9; $\lambda_{\text{max}} = 257$ nm v poměru 1:9 (A), methanol – zásaditá složka BR pufru o pH 12,8; $\lambda_{\text{max}} = 272$ nm v poměru 1:9 (B) a methanol – BR pufr o pH 4,0; $\lambda_{\text{max}} = 272$ nm v poměru 1:9 (C), měřeno v 1,0 mm křemenné kyvetě proti slepému vzorku.

Tabulka 4

Naměřené hodnoty změny absorbance roztoku 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) v prostředí methanol – kyselá složka BR pufru o pH 1,9; $\lambda_{\text{max}} = 257 \text{ nm}$ v poměru 1:9, methanol – zásaditá složka BR pufru o pH 12,8; $\lambda_{\text{max}} = 272 \text{ nm}$ v poměru 1:9 a methanol – BR pufr o pH 4,0; $\lambda_{\text{max}} = 272 \text{ nm}$ v poměru 1:9 s časem v 1,0 mm křemenné kyvetě proti slepému vzorku.

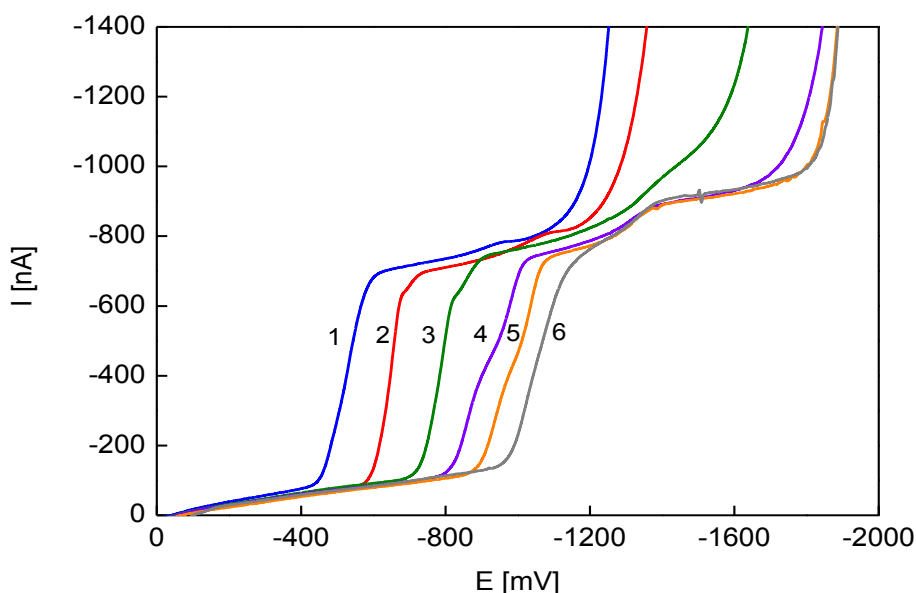
t [min]	A při pH=1,9 [AU]	A při pH=12,8 [AU]	A při pH= 4,0 [AU]
0	0,827	0,496	0,439
1	0,822	0,499	0,440
2	0,818	0,501	0,436
3	0,822	0,501	0,437
4	0,824	0,501	0,436
5	0,824	0,500	0,436
6	0,822	0,500	0,436
7	0,822	0,499	0,437
8	0,821	0,500	0,436
9	0,821	0,499	0,435
10	0,819	0,499	0,435
11	0,819	0,499	0,436
12	0,819	0,499	0,436
13	0,819	0,497	0,435

3. Polarografické stanovení 2-amino-9-fluorenonu

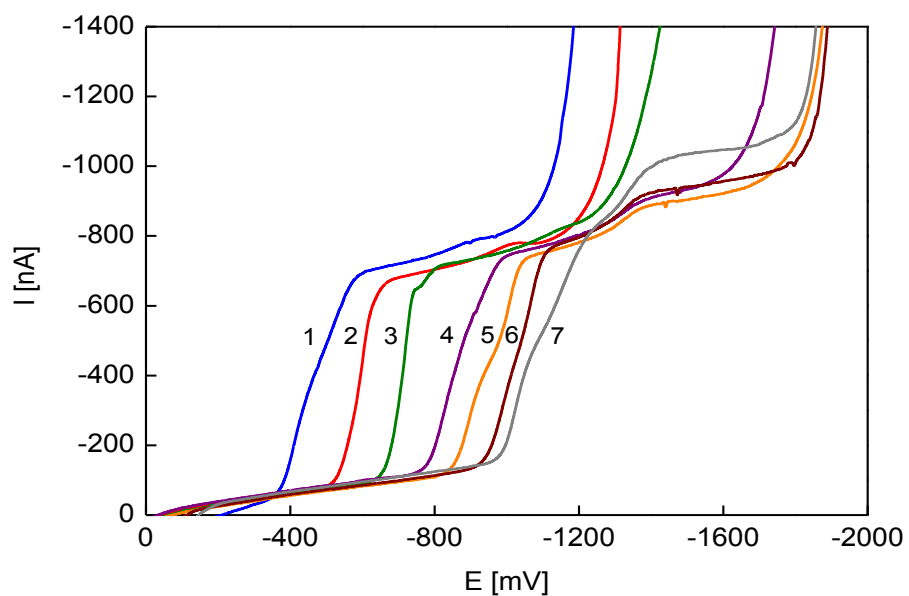
3.1 DC tast polarografie

3.1.1 Vliv pH na polarografické chování 2-amino-9-fluorenonu

Polarografické chování 2-AFN bylo sledováno metodou DCTP na DME v prostředí BR pufr – methanol (9:1) v rozmezí pH použitého BR pufru 1,9 až 12,8. Pro silně kyselé prostředí o pH 1,0 byla použita zředěná 0,1 mol dm⁻³ kyselina chlorovodíková. Koncentrace 2-AFN byla 1×10⁻⁴ mol dm⁻³. Naměřené polarografické křivky zobrazují obr. 6 a 7. Na polarografických odezvách je možné pozorovat jednu dobře vyvinutou vlnu, jejíž půlvlnový potenciál se s rostoucím pH posunuje k negativnějším hodnotám. Tato polarografická vlna, jež v celém měřeném rozsahu pH pravděpodobně odpovídá redukčnímu ději, při němž dochází k výměně stejného počtu elektronů, se v neutrálním a alkalickém prostředí (pH BR pufru 7,0 – 12,8) znatelně štěpí na vlny dvě. S tímto jevem se na polarogramech ve výše uvedeném prostředí zároveň objevuje vlna druhá, s půlvlnovým potenciálem negativnějším oproti rozštěpené vlně první. Získané hodnoty I_{lim} a $E_{1/2}$ jsou zaznamenány v tabulce 5. Závislost $E_{1/2}$ na výsledném pH vodně-methanolického roztoku (pH^*) znázorněna na obr. 8.



Obr. 6 Polarogramy 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³) měřené metodou DCTP na DME v prostředí BR pufr – methanol (9:1). Zobrazeny jsou sudé hodnoty pH BR pufru 1,9 (1); 4,0 (2); 6,0 (3); 8,0 (4); 10,0 (5); 12,0 (6).



Obr. 7 Polarogramy 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené metodou DCTP na DME v prostředí BR pufr – methanol (9:1). Zobrazeny jsou liché hodnoty pH BR pufru 1,0 (1); 3,0 (2); 5,0 (3); 7,0 (4); 9,0 (5); 11,0 (6); 12,8 (7).

Tabulka 5

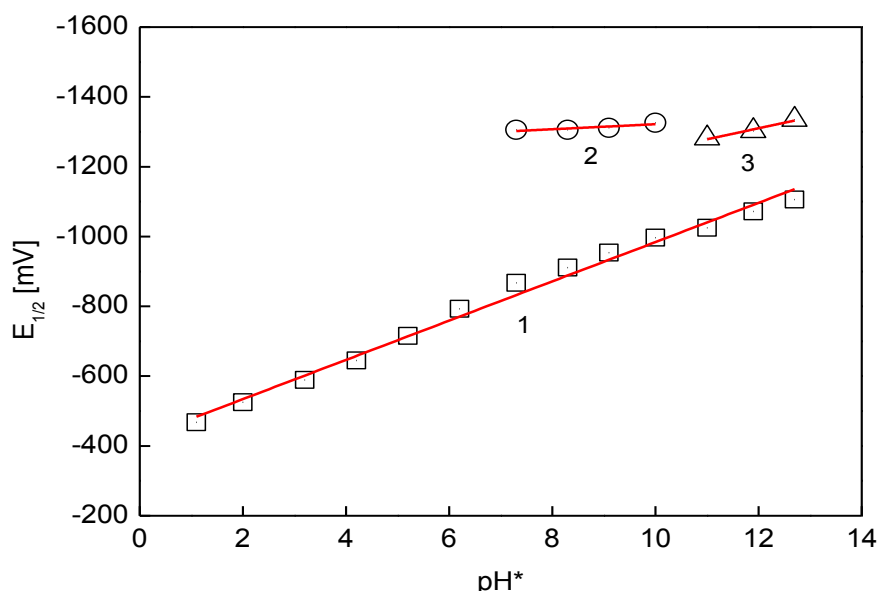
Naměřené hodnoty I_{lim} a $E_{1/2}$ pro 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) při různých pH v prostředí BR pufr – methanol (9:1) metodou DCTP na DME.

pH	pH [*]	$E_{1/2}^1$ [mV]	I_{lim}^1 [nA]	$E_{1/2}^2$ [mV]	I_{lim}^2 [nA]
1,0	1,1	−468	−574	— ^a	— ^a
1,9	2,0	−525	−577	— ^a	— ^a
3,0	3,2	−589	−563	— ^a	— ^a
4,0	4,2	−645	−573	— ^a	— ^a
5,0	5,2	−715	−580	— ^a	— ^a
6,0	6,2	−793	−577	— ^a	— ^a
7,0	7,3	−867	−572	−1306	−46
8,0	8,3	−911	−577	−1306	−57
9,0	9,1	−954	−574	−1311	−61
10,0	10,0	−997	−577	−1326	−71
11,0	11,0	−1025	−577	−1281	−115
12,0	11,9	−1072	−573	−1302	−132
12,8	12,7	−1106	−575	−1335	−158

$E_{1/2}^1$ – půlvlnový potenciál první vlny [mV], I_{lim}^1 – limitní difusní proud první vlny [nA],

$E_{1/2}^2$ – půlvlnový potenciál druhé vlny [mV], I_{lim}^2 – limitní difusní proud druhé vlny [nA]

^a – vlna nebyla pozorována



Obr. 8 Závislost půlvolného potenciálu 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na výsledném pH roztoku (pH^*), měřeno metodou DCTP na DME v prostředí BR pufr – methanol (9:1): první vlna v rozmezí pH BR pufru 1,9 až 12,8 (1); druhá vlna v rozmezí pH BR pufru 7,0 až 10,0 (2) a druhá vlna v rozmezí pH BR pufru 11,0 až 12,8 (3).

Elektrochemická redukovatelnost určité funkční skupiny závisí na zbytku molekuly i na složení základního elektrolytu. Protonizace molekuly analytu vede ke snížení elektronové hustoty a ke snadnějšímu přijetí elektronu. Tím dochází k posunu půlvolného potenciálu k pozitivnějším hodnotám [20,21]. Metodou lineární regrese byly pro závislost půlvolného potenciálu vln na pH^* roztoku získány tyto rovnice:

a) první vlna v rozmezí pH BR pufru 1,9 až 12,8

$$E_{1/2}^1 [\text{mV}] = -421,7 - 56,2 \text{ pH}^* \quad (R^2 = 0,9902),$$

b) druhá vlna v rozmezí pH BR pufru 7,0 až 10,0

$$E_{1/2}^2 [\text{mV}] = -1249,7 - 7,2 \text{ pH}^* \quad (R^2 = 0,6527),$$

c) druhá vlna v rozmezí pH BR pufru 11,0 až 12,8

$$E_{1/2}^2 [\text{mV}] = -931,1 - 31,9 \text{ pH}^* \quad (R^2 = 0,9483).$$

3.1.2 Mechanismus elektrodové reakce probíhající na DME

2-AFN je polarograficky redukovatelná látka, jejíž elektrochemická aktivita je v prostředí BR pufr – methanol (9:1) závislá na pH. Karbonylová skupina na aromatickém systému (oxoskupina) je obecně redukována v protických prostředích za výměny 2 elektronů na skupinu alkoholovou [16,19].

3.1.2.1 Redukční mechanismus v kyselém prostředí

V kyselém prostředí dochází k redukci 2-AFN pravděpodobně ve dvou redukčních krocích, jež mají přibližně stejnou reakční rychlost, díky čemuž oba kroky dávají vzniknout polarografické odezvě v podobě jedné 2-elektronové vlny. První redukční krok (viz schéma 1) je reverzibilní a odpovídá redukci pomocí jednoho elektronu a vodíkového kationu na volný radikál. Vzniklý radikál je nevratně redukován dalším elektronem a protonem na alkohol (viz schéma 2). Druhý redukční krok je ireverzibilní. Druhá vlna o vyšším negativním půlvinovém potenciálu není pozorovatelná v kyselém prostředí [16,25].

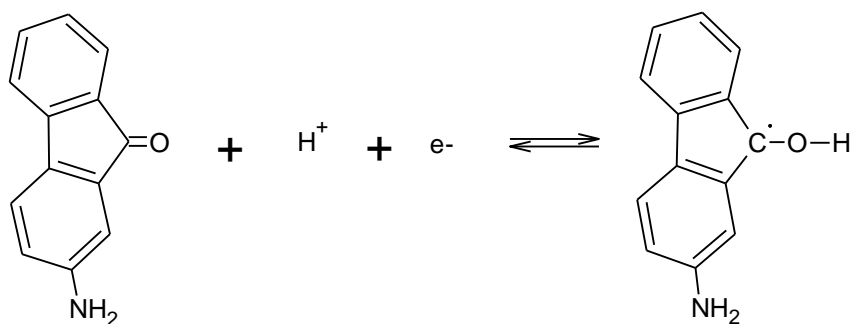


Schéma 1. Navržený mechanismus prvního kroku elektrochemické redukce 2-AFN na DME v kyselém prostředí.

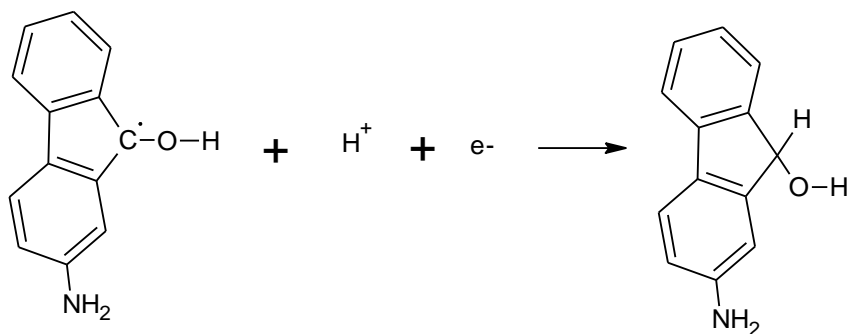


Schéma 2. Navržený mechanismus druhého kroku elektrochemické redukce 2-AFN na DME v kyselém prostředí.

3.1.2.2 Redukční mechanismus v neutrálním a zásaditém prostředí

V neutrálním a alkalickém prostředí z důvodu malé koncentrace vodíkových ionů dochází k redukci oxoskupiny pomocí elektronu z elektrody za vzniku radikál-anionu v prvním kroku (viz schéma 3). Radikál-anion se následně kombinuje buď s protony za vzniku nenabitého radikálu (viz schéma 3) nebo se sodíkovými kationy (viz schéma 4). Obě tyto reakce probíhají na rozhraní roztoku a elektrody v různé míře v závislosti na pH. Výše popsany redukční krok je zahrnutý v polarografické odezvě, která tvoří první rozštěpenou část první polarografické vlny 2-AFN v neutrálním a zásaditém prostředí.

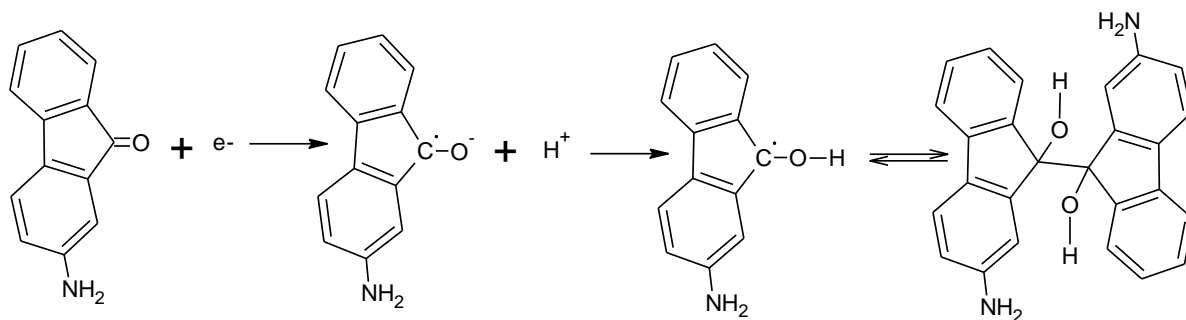


Schéma 3. Navržený mechanismus prvního a druhého kroku elektrochemické redukce 2-AFN na DME v neutrálním prostředí.

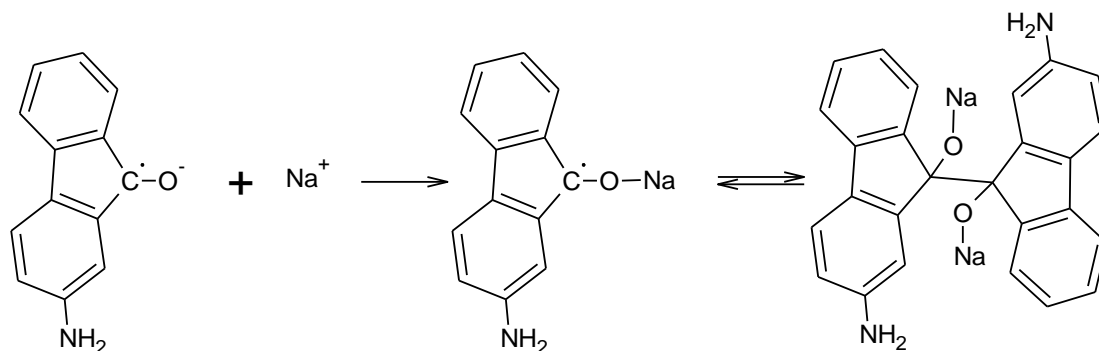


Schéma 4. Navržený mechanismus druhého kroku elektrochemické redukce 2-AFN na DME v zásaditěm prostředí.

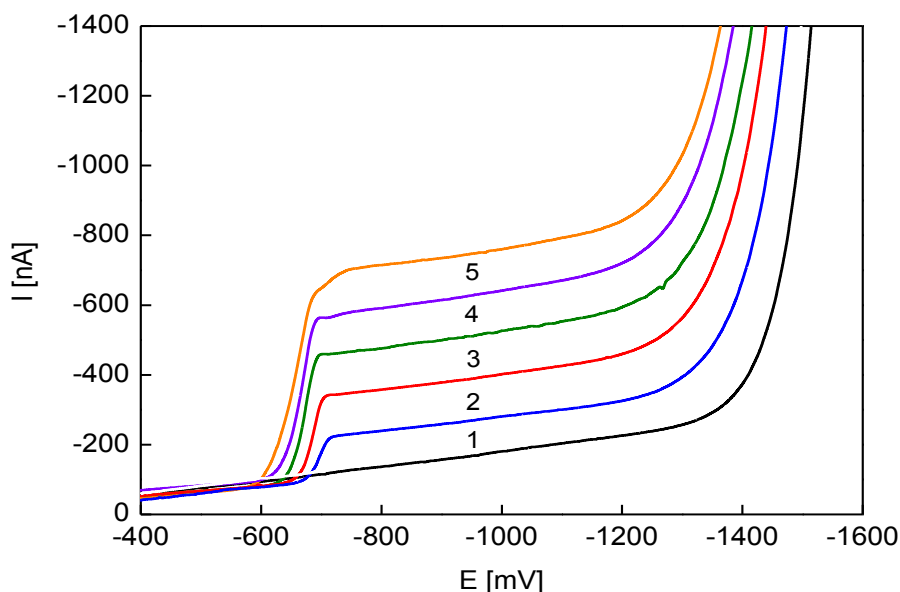
Druhá část rozštěpené první polarografické vlny pak odpovídá stejnému kroku, jako tomu je v kyselém prostředí, tedy zhášení volného radikálu za vzniku alkoholu (viz schéma 2). Z faktu, že druhá část rozštěpené první vlny má negativnější potenciál, lze usuzovat, že zhášení protonu v případě neutrálních a zásaditých prostředí je dějem energeticky náročnějším a že tedy případná dimerizace (zhášení radikálu za vzniku pinakolátu) může u části molekul zredukovaných v prvním kroku předcházet vlastnímu zhášení radikálu na alkohol [16,26].

Druhá vlna je pak pravděpodobně důsledkem zhášecí reakce zbývajících radikálových anionů sodíkového typu (reakcí s kationem sodíku vznikne radikál 2-amino-9-fluorenolu sodného, viz schéma 4), které prozatím nezreagovaly s protony nebo nepodlehly dimerizaci, ale samy vstoupily do zhášecí reakce za vzniku sodného alkoholátu (obdobu reakce viz schéma 2). Radikál 2-amino-9-fluorenolátu sodného je tím stabilnější, čím je prostředí zásaditější, a tedy vzniká v zásaditěm prostředí i ve vyšší míře oproti 2-amino-9-fluorenolu či pinakolátu konstrukce 9,9'-bifluorenolátu sodného, což potvrzuje i výška druhé vlny, která roste se zvyšujícím se pH (viz tabulka 5), a tedy i s koncentrací přítomných sodných kationů v základním elektrolytu [16,26].

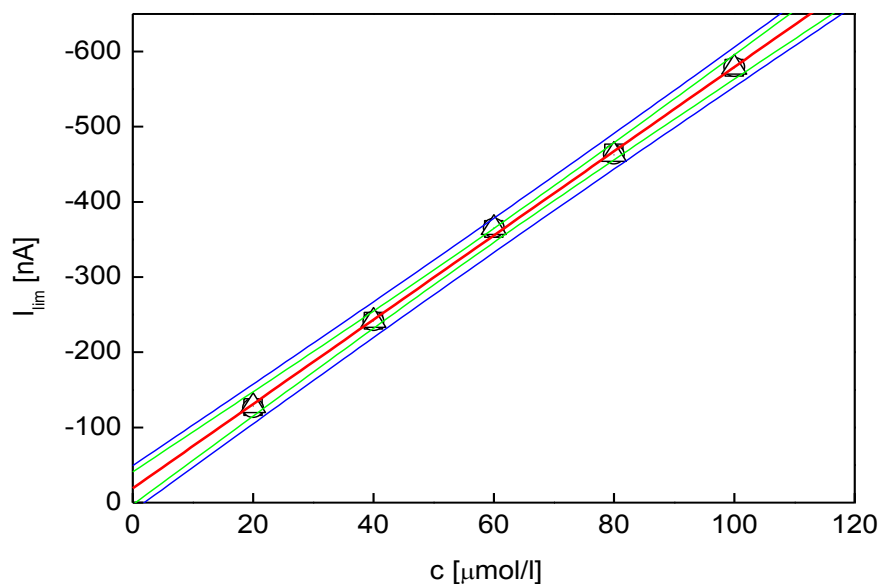
Potvrzení navrhovaného redukčního mechanismu 2-AFN a přiřazení jednotlivých pozorovaných vln určitým dějům však bude potřebovat podrobnější studium elektrochemického chování této látky (cyklická voltametrie, potenciostatické coulometrie). Této problematice bude věnována pozornost při plánovaném pokračování v této práci.

3.1.3 Koncentrační závislosti odezvy 2-amino-9-fluorenonu

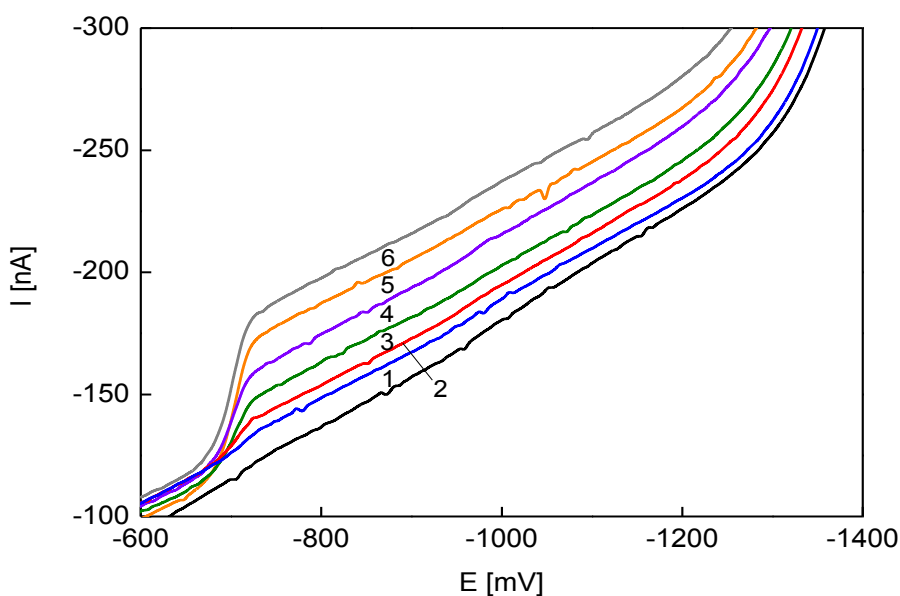
Optimální prostředí pro měření koncentračních závislostí bylo vybráno BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1). Vlna při tomto pH byla nejstrmější a nejlépe vyvinutá. Koncentrační závislosti byly měřeny od koncentrace 1×10^{-4} mol dm^{-3} až po nejmenší možnou měřitelnou koncentraci. V rozmezí koncentrací 2×10^{-5} mol dm^{-3} až 1×10^{-4} mol dm^{-3} byly naměřeny polarografické křivky zobrazené na obr. 9 a odpovídající kalibrační závislost (viz obr. 10). Následně bylo proměřeno rozmezí koncentrací 1×10^{-6} až 1×10^{-5} mol dm^{-3} . Naměřené polarografické křivky ukazuje obr. 11 a kalibrační závislost obr. 12. Pro koncentraci nižší než 1×10^{-6} mol dm^{-3} již nebylo možno získané polarogramy vyhodnotit. Parametry kalibračních přímek pro stanovení 2-AFN v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1) jsou uvedeny v tabulce 6. Úseky regresních přímek změřených v koncentračním rozmezí 2×10^{-5} až 1×10^{-4} mol dm^{-3} i v koncentračním rozmezí 1×10^{-6} až 1×10^{-5} mol dm^{-3} leží uvnitř příslušných konfidenčních pásů, lze je tedy označit za statisticky nevýznamně odlehle od nulové hodnoty, a je tedy možné použití metody standardního přídatku pro polarografické stanovení 2-AFN pomocí DCTP.



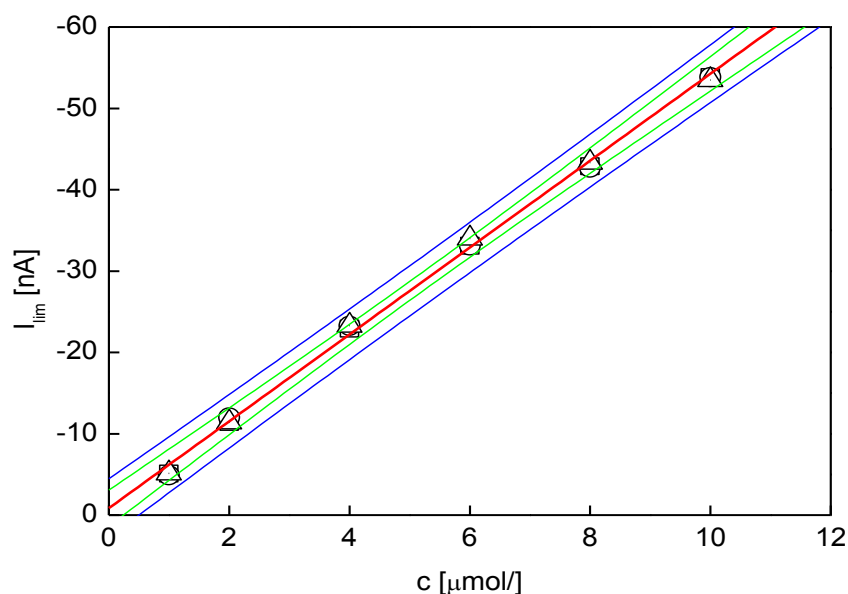
Obr. 9 Polarogramy 2-AFN měřené metodou DCTP na DME v rozmezí koncentrací 2×10^{-5} až 1×10^{-4} mol dm^{-3} v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1). Koncentrace 2-AFN v (mol dm^{-3}): 2×10^{-5} (1); 4×10^{-5} (2); 6×10^{-5} (3); 8×10^{-5} (4); 1×10^{-4} (5); černá křivka znázorňuje základní elektrolyt.



Obr. 10 Závislost limitního proudu na koncentraci 2-AFN v koncentračním rozmezí 2×10^{-5} až 1×10^{-4} mol dm^{-3} . Měřeno metodou DCTP na DME v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1). Predikční (modré křivky) a konfidenční pásy (zelené křivky) jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.



Obr. 11 Polarogramy 2-AFN měřené technikou DCTP na DME v rozmezí koncentrací 1×10^{-6} až 1×10^{-5} mol dm^{-3} v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1). Koncentrace 2-AFN v (mol dm^{-3}): 1×10^{-6} (1); 2×10^{-6} (2); 4×10^{-6} (3); 6×10^{-6} (4); 8×10^{-6} (5); 1×10^{-5} (6); černá křivka znázorňuje základní elektrolyt.



Obr. 12 Závislost limitního proudu na koncentraci 2-AFN v koncentračním rozmezí 2×10^{-6} až 1×10^{-5} mol dm⁻³. Měřeno metodou DCTP na DME v prostředí BR pufru o pH 4,0 – methanol (9:1). Predikční (modré křivky) a konfidenční pásy (zelené křivky) jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabulka 6

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 2-AFN metodou DCTP na DME v prostředí BR pufru o pH 4,0 – methanol (9:1).

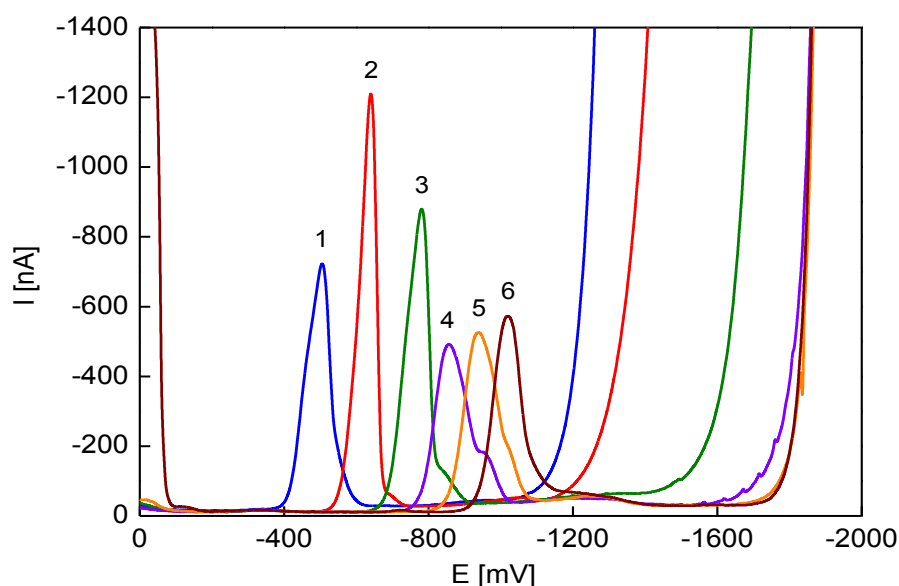
Koncentrační rozmezí [mol dm ⁻³]	Směrnice [mA dm ³ mol ⁻¹]	Úsek [nA]	R ²	L _Q [mol dm ⁻³]
2×10^{-5} až 1×10^{-4}	$-5,61 \pm 0,10$	$-19,1 \pm 6,9$	0,9986	–
1×10^{-6} až 1×10^{-5}	$-5,34 \pm 0,13$	$-0,85 \pm 0,80$	0,9970	5×10^{-7}

Výpočtem získaná mez stanovitelnosti 5×10^{-7} mol dm⁻³ je menší než nejnížší stanovovaná možná koncentrace. Byl učiněn pokus o ověření stanovitelnosti koncentrace 5×10^{-7} mol dm⁻³, který však nebyl úspěšný. Za nejnížší prakticky stanovitelnou koncentraci lze tedy označit 1×10^{-6} mol dm⁻³.

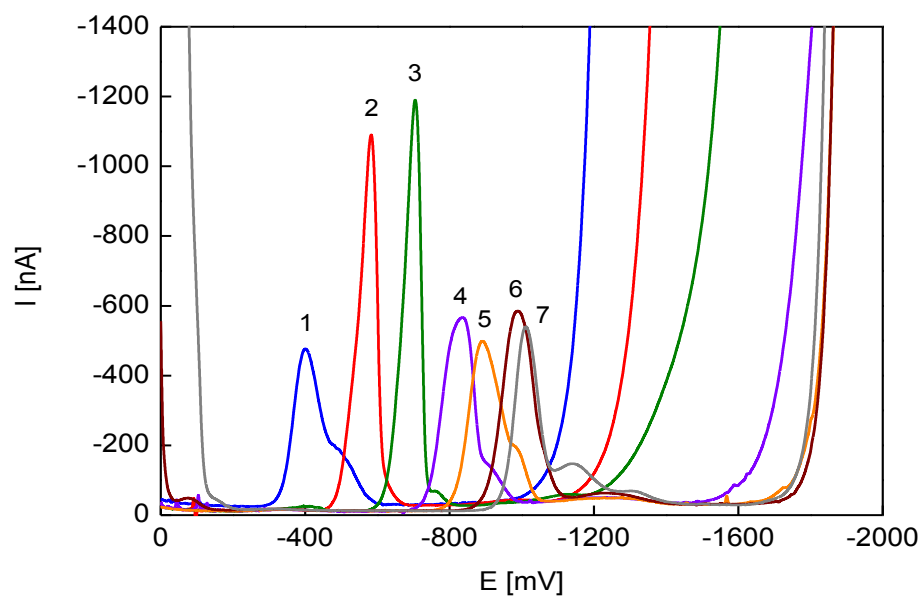
3.2 Diferenční pulsní polarografie

3.2.1 Vliv pH na polarografické chování 2-amino-9-fluorenonu

Polarografické chování 2-AFN bylo sledováno metodou DPP na DME v prostředí BR pufr – methanol (9:1) v rozmezí pH použitého BR pufru 1,9 až 12,8. Pro silně kyselé prostředí byla použita podobně jako u DCTP na DME zředěná $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ kyselina chlorovodíková o pH 1,0. Koncentrace 2-AFN byla $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Naměřené polarografické křivky ukazuje obr. 13 a obr. 14. Na polarografických odezvách lze pozorovat jeden dobře vyvinutý pík a jeden menší druhý pík. Na rozdíl od DCTP na DME je však toto rozštěpení pozorovatelné prakticky v celém rozmezí měřených pH. Potenciály obou píků se s rostoucím pH posunují k negativnějším hodnotám potenciálu. Druhý pík je více zřetelný a tím i lépe vyhodnotitelný v zásaditém prostředí. Získané hodnoty I_p a E_p jsou zaznamenány v tabulce 7. Závislost E_p na výsledném pH vodně-methanolického roztoku (pH^*) znázorněna na obr. 15.



Obr. 13 Polarogramy 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené metodou DPP na DME v prostředí BR pufr – methanol (9:1). Zobrazeny jsou sudé hodnoty pH BR pufru 1,9 (1); 4,0 (2); 6,0 (3); 8,0 (4); 10,0 (5); 12,0 (6).



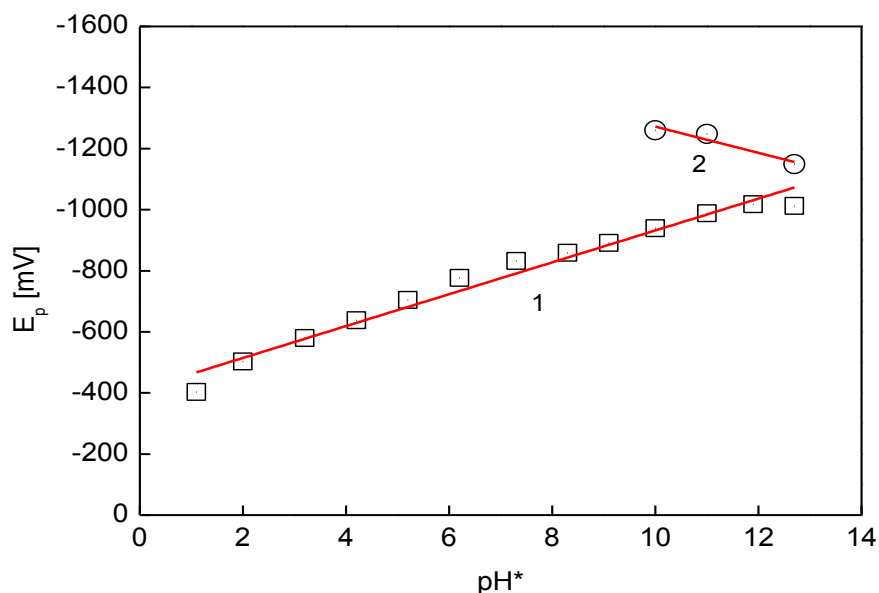
Obr. 14 Polarogramy 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) měřené metodou DPP na DME v prostředí BR pufr – methanol (9:1). Zobrazeny jsou liché hodnoty pH BR pufru 1,0 (1); 3,0 (2); 5,0 (3); 7,0 (4); 9,0 (5); 11,0 (6); 12,8 (7).

Tabulka 7

Naměřené hodnoty I_p a E_p 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³) při různých pH metodou DPP na DME v prostředí BR pufr – methanol (9:1).

pH	pH*	E_p^1 [mV]	I_p^1 [nA]	E_p^2 [mV]	I_p^2 [nA]
1,0	1,1	-403	-439	— ^a	— ^a
1,9	2,0	-503	-672	— ^a	— ^a
3,0	3,2	-580	-993	— ^a	— ^a
4,0	4,2	-638	-1104	— ^a	— ^a
5,0	5,2	-704	-1084	— ^a	— ^a
6,0	6,2	-776	-857	— ^a	— ^a
7,0	7,3	-832	-534	— ^a	— ^a
8,0	8,3	-859	-458	— ^a	— ^a
9,0	9,1	-891	-464	— ^a	— ^a
10,0	10,0	-939	-489	-1260	-18
11,0	11,0	-988	-543	-1248	-19
12,0	11,9	-1018	-521	— ^a	— ^a
12,8	12,7	-1012	-443	-1149	-37

E_p^1 – potenciál prvního píku [mV], I_p^1 – proud prvního píku [nA], E_p^2 – potenciál druhého píku [mV], I_p^2 – proud druhého píku [nA], ^a – pík nebyl pozorován



Obr. 15 Závislost potenciálu pík 2-AFN ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) na výsledném pH roztoku (pH^*), měřeno metodou DPP na DME v prostředí BR pufr – methanol (9:1): první pík v rozmezí pH BR pufru 1,9 až 12,8 (1); druhý pík v rozmezí pH BR pufru 10,0 až 12,8 (2).

Metodou lineární regrese byly pro závislost potenciálu píků na pH^* roztoku získány tyto rovnice:

a) první pík v rozmezí pH BR pufru 1,9 až 12,8,

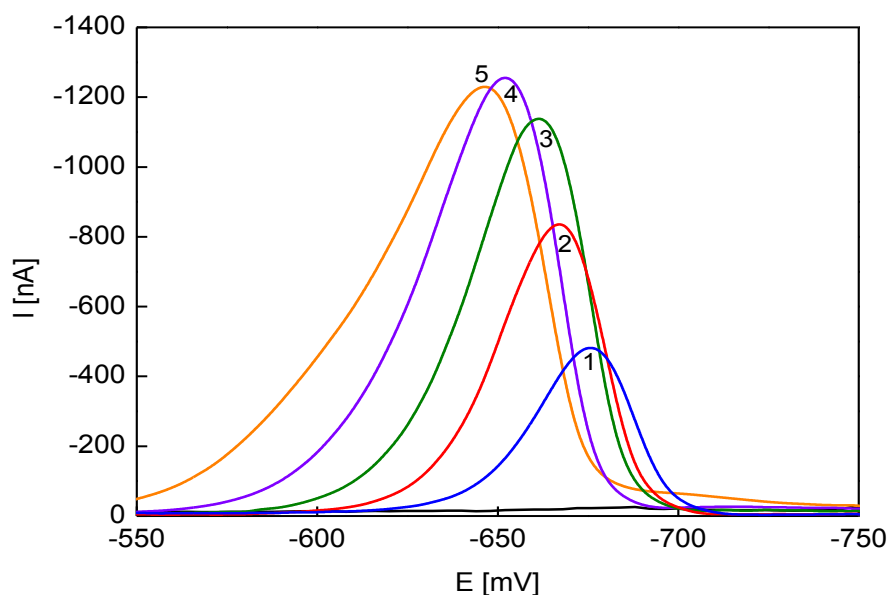
$$E_p^1 [\text{mV}] = -410,2 - 52,2 \text{ pH}^* \quad (R^2 = 0,9717)$$

b) druhý pík v rozmezí pH BR pufru 10,0 až 12,8,

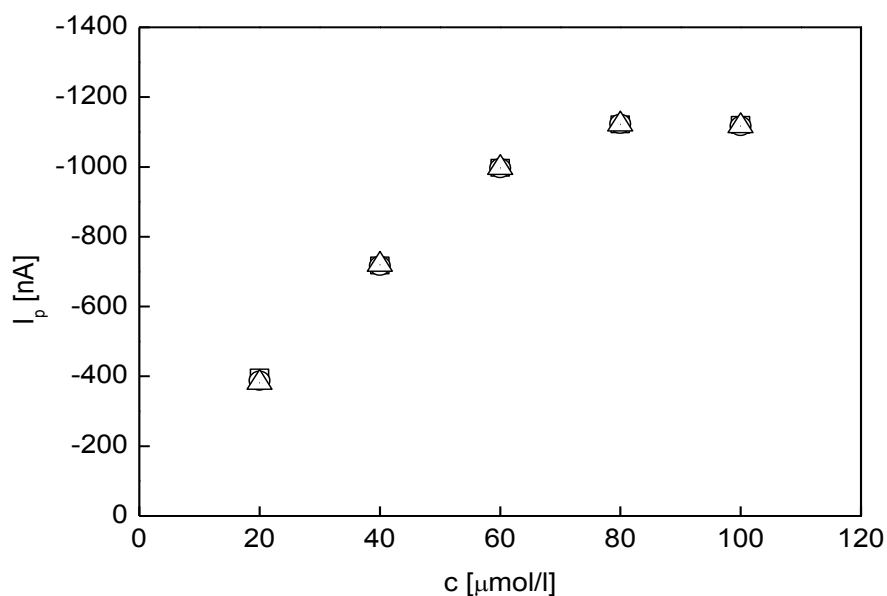
$$E_p^2 [\text{mV}] = -1701,9 + 42,93381 \text{ pH}^* \quad (R^2 = 0,8511).$$

3.2.2 Koncentrační závislosti odezvy 2-amino-9-fluorenonu

Pro měření koncentrační závislosti, bylo rovněž vybráno optimální prostředí BR pufru o pH 4,0 pufr – methanol (9:1), protože v tomto prostředí 2-AFN poskytoval nejvyšší a nejlépe vyvinutý pík. Koncentrační závislosti byly měřeny od koncentrace $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ až po nejmenší možnou měřitelnou koncentraci. V rozmezí koncentrací $2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ až $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ byly naměřeny polarografické křivky (viz obr. 16) a kalibrační závislost (viz obr. 17). Úsek regresní přímky změřené v koncentračním rozmezí 1×10^{-7} až $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ je statisticky nevýznamně odlehly od nulové hodnoty, což neplatí pro úsek regresní přímky v koncentračním rozmezí 2×10^{-6} až $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.



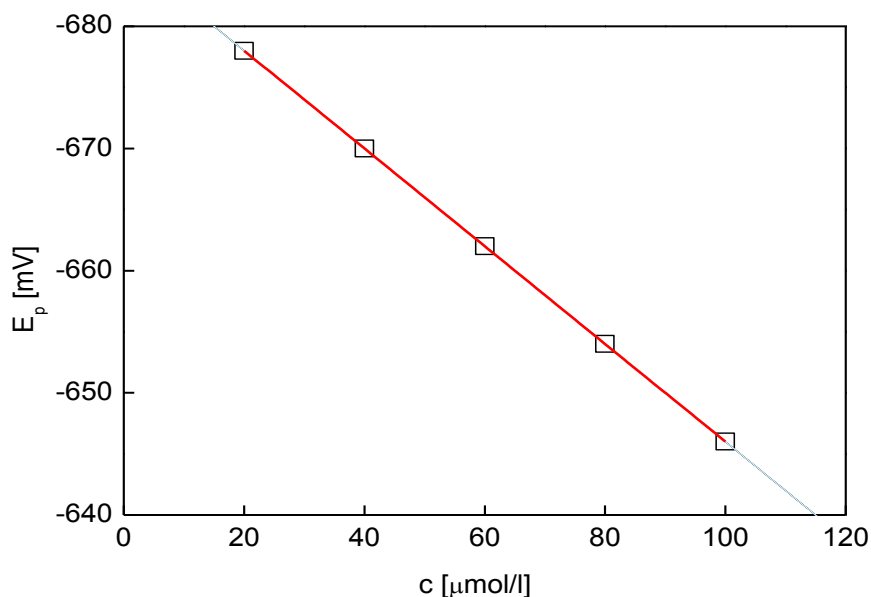
Obr. 16 Polarogramy 2-AFN měřené metodou DPP na DME v rozmezí koncentrací 2×10^{-5} až 1×10^{-4} mol dm $^{-3}$ v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1). Koncentrace 2-AFN v (mol dm $^{-3}$): 2×10^{-5} (1); 4×10^{-5} (2); 6×10^{-5} (3); 8×10^{-5} (4); 1×10^{-4} (5); černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



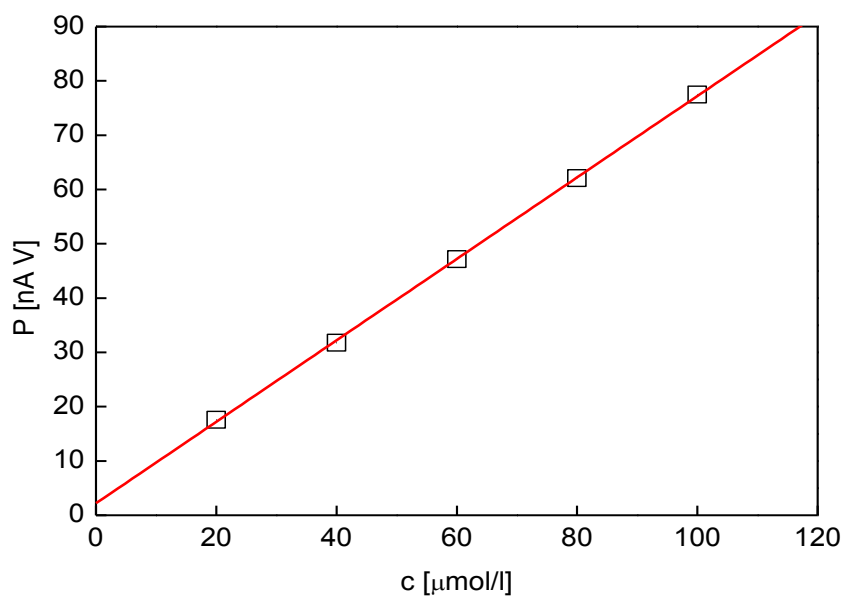
Obr. 17 Závislost proudu píku na koncentraci 2-AFN v koncentračním rozmezí 2×10^{-5} až 1×10^{-4} mol dm $^{-3}$. Měřeno metodou DPP na DME v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1).

V koncentračním rozmezí 2×10^{-5} až 1×10^{-4} mol dm $^{-3}$ došlo k posunu potenciálu píku se snižující se koncentrací k zápornějším hodnotám (viz obr. 18) a koncentrační závislost jeví značnou odchylku od linearity. Vysvětlení posunu potenciálu píku a nelineární kalibrační závislosti proudu píku na koncentraci lze spatřovat v průběhu elektrodové reakce a jejím

mechanismu – v rámci jednoho signálu jsou zahrnuty dva redukční děje, kdy potenciál píku prvního děje je závislý na koncentraci látky v okolí pracovní elektrody. Proto byl učiněn pokus vyhodnocení koncentrační závislosti z plochy takto vzniklého píku. Integrací píku byla získána plocha píku P . Závislost plochy píku na koncentraci je lineární (viz obr. 19).

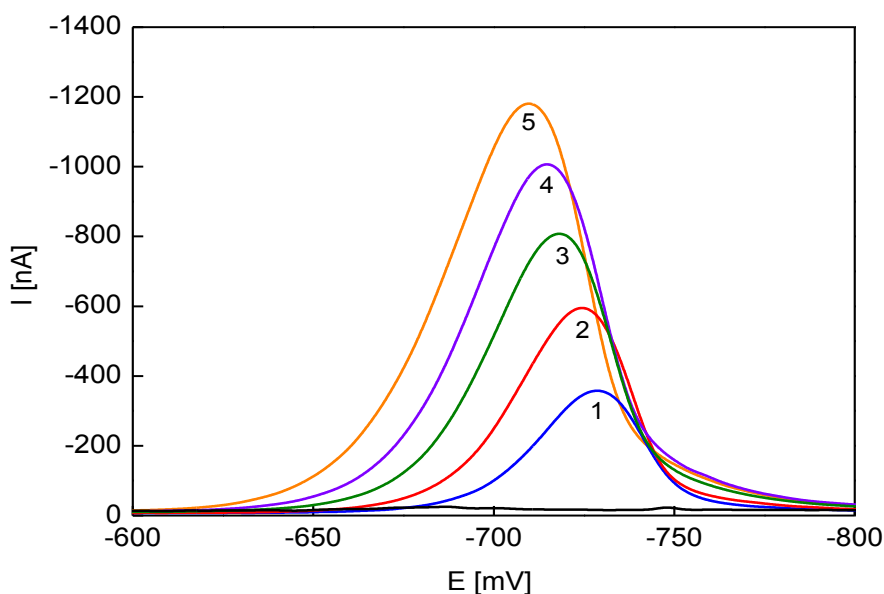


Obr. 18 Závislost potenciálu píku E_p na koncentraci 2-AFN v koncentračním rozmezí 2×10^{-5} až 1×10^{-4} mol dm^{-3} . Měřeno metodou DPP na DME v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1).

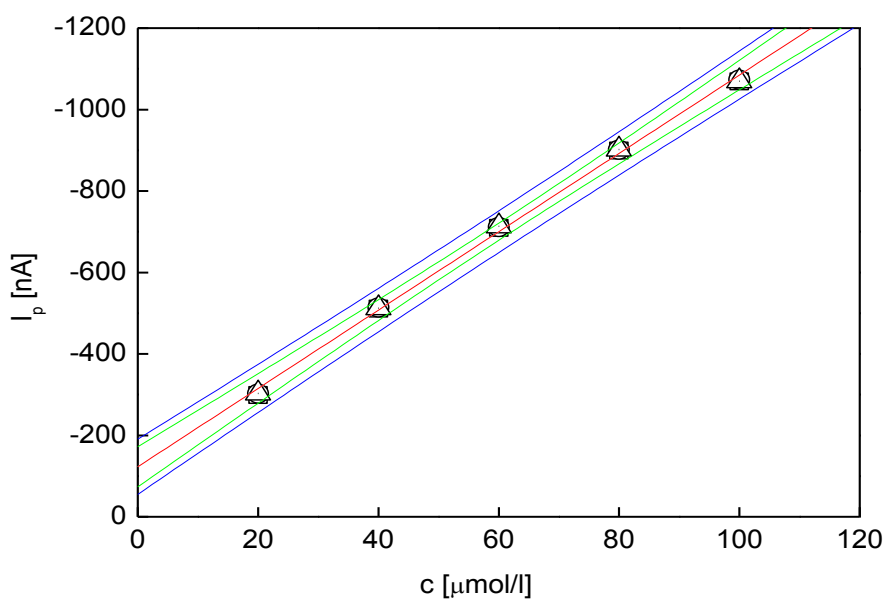


Obr. 19 Závislost plochy píku na koncentraci 2-AFN v koncentračním rozmezí 2×10^{-5} až 1×10^{-4} mol dm^{-3} v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1).

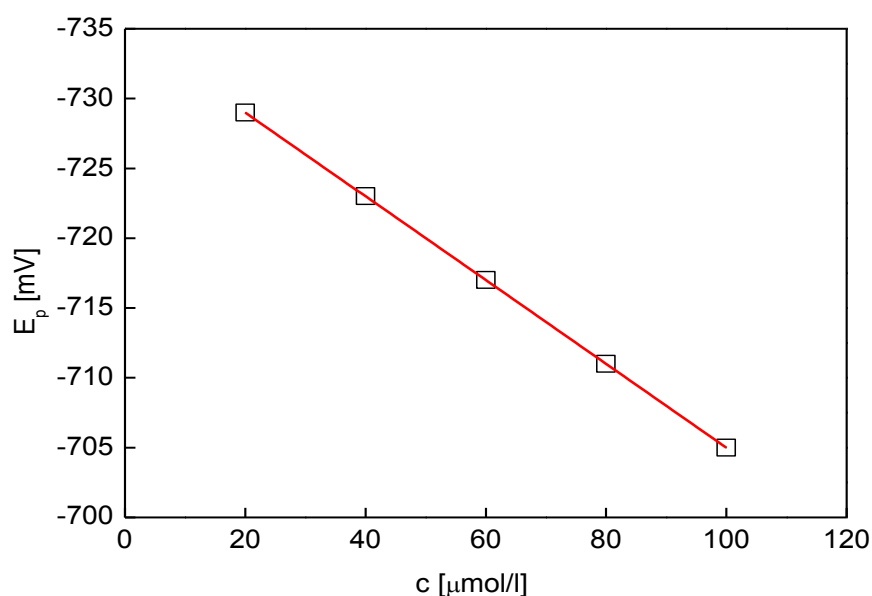
Pro porovnání posunu potenciálu píku a nelineární kalibrační křivky závislosti proudu píku 2-AFN na koncentraci v závislosti na prostředí bylo měření provedeno rovněž v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (1:1). Získané závislosti jsou zobrazeny na obr. 20, 21 a 22.



Obr. 20 Polarogramy 2-AFN měřené metodou DPP na DME v rozmezí koncentrací 2×10^{-5} až 1×10^{-4} mol dm^{-3} v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (1:1). Koncentrace 2-AFN v (mol dm^{-3}): 2×10^{-5} (1); 4×10^{-5} (2); 6×10^{-5} (3); 8×10^{-5} (4); 1×10^{-4} (5); černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



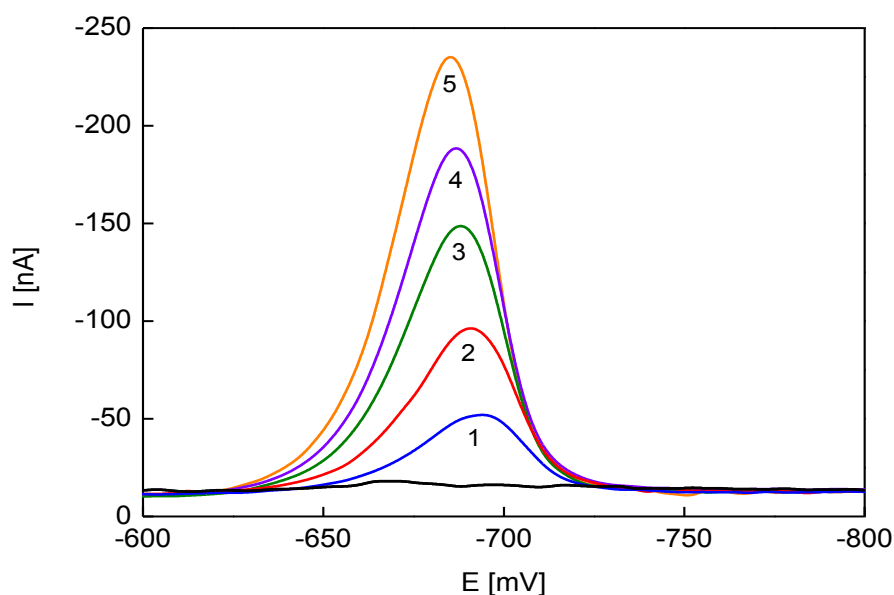
Obr. 21 Závislost I_p na koncentraci 2-AFN v koncentračním rozmezí 2×10^{-5} až 1×10^{-4} mol dm^{-3} . Měřeno metodou DPP na DME v prostředí BR pufr o pH 4,0. – methanol (1:1). Predikční (modré křivky) a konfidenční pásy (zelené křivky) jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.



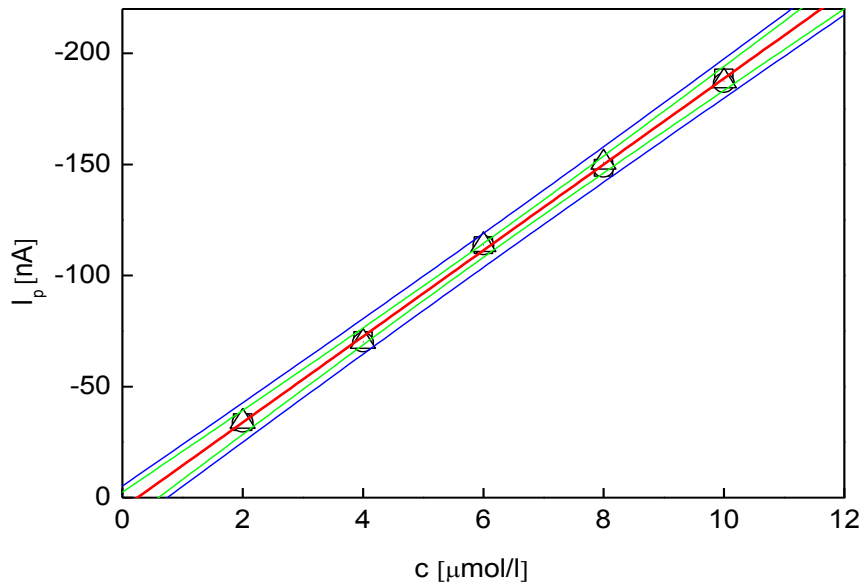
Obr. 22 Závislost potenciálu píku E_p na koncentraci 2-AFN v koncentračním rozmezí 2×10^{-5} až $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Měřeno metodou DPP na DME v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (1:1).

V takto zvoleném prostředí došlo k menšímu posunu potenciálu píku mezi jednotlivými píky při změně koncentrace 2-AFN. Vyšší množství alkoholu způsobilo vyšší pH a tím posun k negativnějším potenciálům oproti poměru 1:9. Kalibrační křivka závislosti proudu píku na koncentraci je lineární.

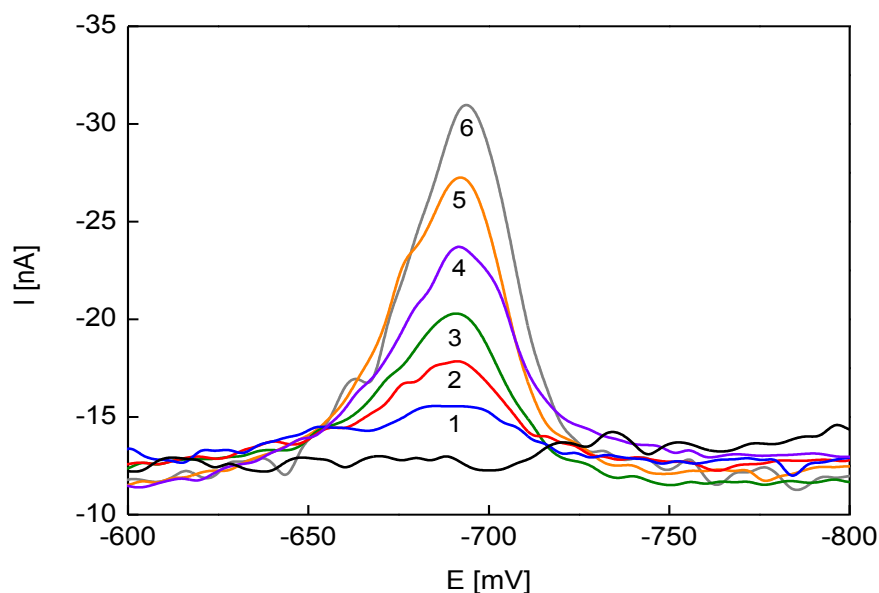
Následně bylo opět v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1) proměřeno rozmezí koncentrací 2×10^{-6} až $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Naměřené polarografické křivky ukazuje obr. 23 a kalibrační závislost obr. 24. Dále bylo měřeno rozmezí 1×10^{-7} až $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Naměřené polarografické křivky ukazuje obr. 25 a kalibrační závislost obr. 26. Pro koncentraci nižší než $1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ již nebylo možno získané polarogramy vyhodnotit. Parametry kalibračních přímků pro stanovení 2-AFN v prostředí BR pufru o pH 4,0 – methanol (9:1) jsou uvedeny v tabulce 8.



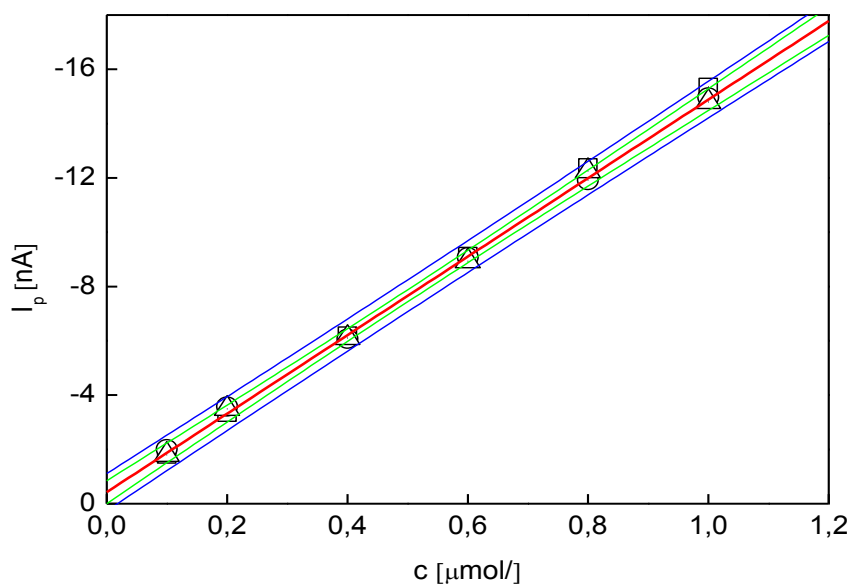
Obr. 23 Polarogramy 2-AFN měřené technikou DPP na DME v rozmezí koncentrací 2×10^{-6} až $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ v prostředí BR pufru o pH 4,0 – methanol (9:1). Koncentrace 2-AFN v (mol dm^{-3}): 2×10^{-6} (1); 4×10^{-6} (2); 6×10^{-6} (3); 8×10^{-6} (4); 1×10^{-5} (5); černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



Obr. 24 Závislost I_p na koncentraci 2-AFN v koncentračním rozmezí 2×10^{-6} až $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Měřeno metodou DPP na DME v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1). Predikční (modré křivky) a konfidenční pásy (zelené křivky) jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.



Obr. 25 Polarogramy 2-AFN měřené technikou DPP na DME v rozmezí koncentrací 1×10^{-7} až $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1). Koncentrace 2-AFN v (mol dm^{-3}): 1×10^{-7} (1); 2×10^{-7} (2); 4×10^{-7} (3); 6×10^{-7} (4); 8×10^{-7} (5); 1×10^{-6} (6); černá křivka náleží základnímu elektrolytu.



Obr. 26 Závislost I_p na koncentraci 2-AFN v koncentračním rozmezí 1×10^{-7} až $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Měřeno metodou DPP na DME v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1). Predikční (modré křivky) a konfidenční pásy (zelené křivky) jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabulka 8

Parametry kalibračních přímek pro stanovení 2-AFN metodou DPP na DME v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1).

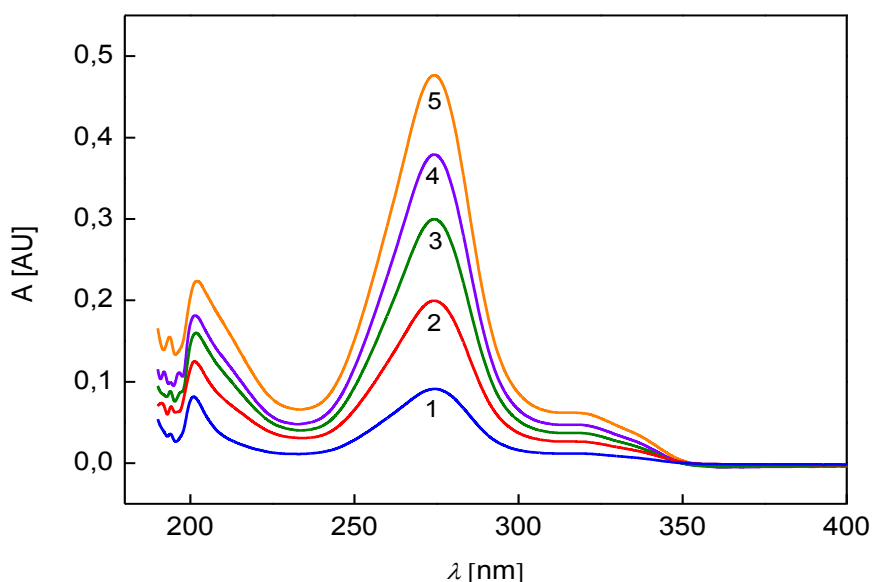
Koncentrační rozmezí [mol dm ⁻³]	Směrnice [mA dm ³ mol ⁻¹]	Úsek [nA]	R ²	L _Q [mol dm ⁻³]
2×10 ⁻⁶ až 1×10 ⁻⁵	-19,36 ± 0,35	4,9 ± 2,3	0,9987	–
1×10 ⁻⁷ až 1×10 ⁻⁶	-14,46 ± 0,25	-0,43 ± 0,15	0,9985	1×10 ⁻⁷

4. UV-VIS spektrofotometrické stanovení

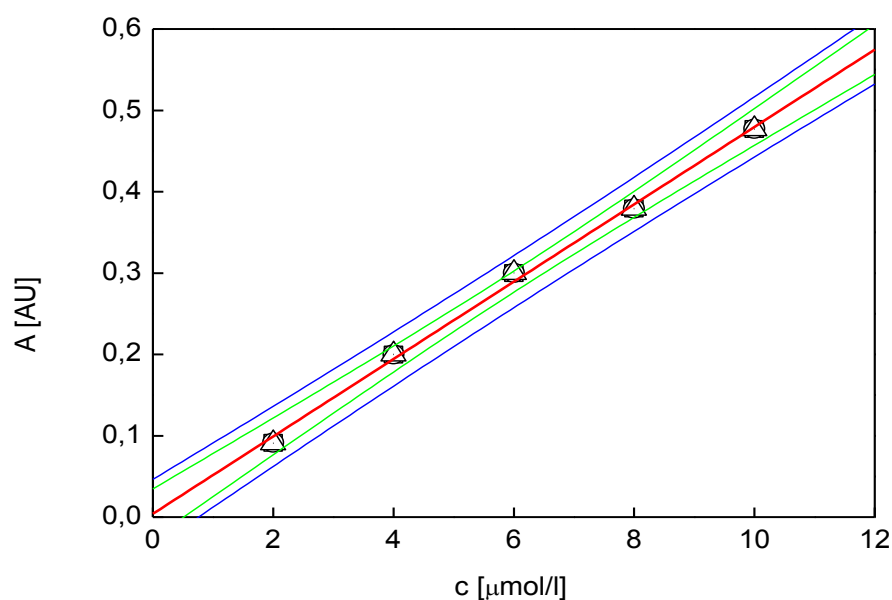
Spektrofotometrické stanovení 2-AFN v UV-VIS oblasti bylo provedeno za účelem srovnání s polarografickým stanovením 2-AFN na DME, především z hlediska dosažitelných mezí stanovitelnosti (L_Q).

4.1 Koncentrační závislost v methanolu

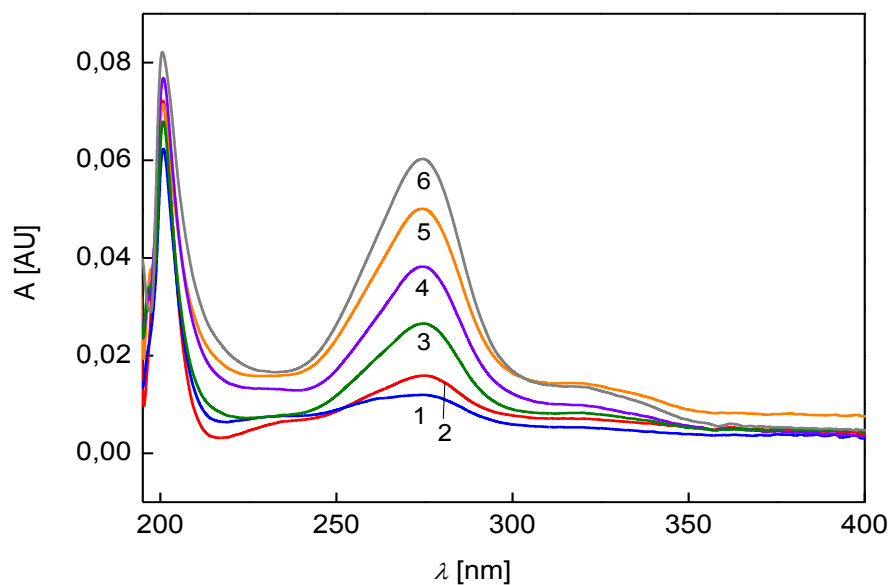
Závislost absorbance na koncentraci 2-AFN byla sledována v prostředí methanolu. 2-AFN v methanolu poskytuje v oblasti od 190 až 1000 nm jeden dobře vyvinutý pík při vlnové délce maxima 274 nm. Koncentrační závislost v rozmezí 2×10^{-5} až 1×10^{-4} mol dm⁻³ v 1,0 cm křemenné kyvetě nebyla změřena, protože při velkých koncentracích 2-AFN absorbuje velké množství záření, které není spektrofotometr schopen vyhodnotit. Bylo tedy změřeno až koncentrační rozmezí 2×10^{-6} mol dm⁻³ až 1×10^{-5} mol dm⁻³ (viz obr. 27) a vyhodnocena příslušná kalibrační závislost (viz obr. 28) a koncentrační rozmezí 1×10^{-7} mol dm⁻³ až 1×10^{-6} mol dm⁻³ (viz obr. 29) a příslušná kalibrační závislost (viz obr. 30) v 1,0 cm křemenné kyvetě. Slepým vzorkem byl čistý methanol. Parametry kalibračních přímk pro UV-VIS spektrofotometrické stanovení 2-AFN jsou uvedeny v tabulce 9.



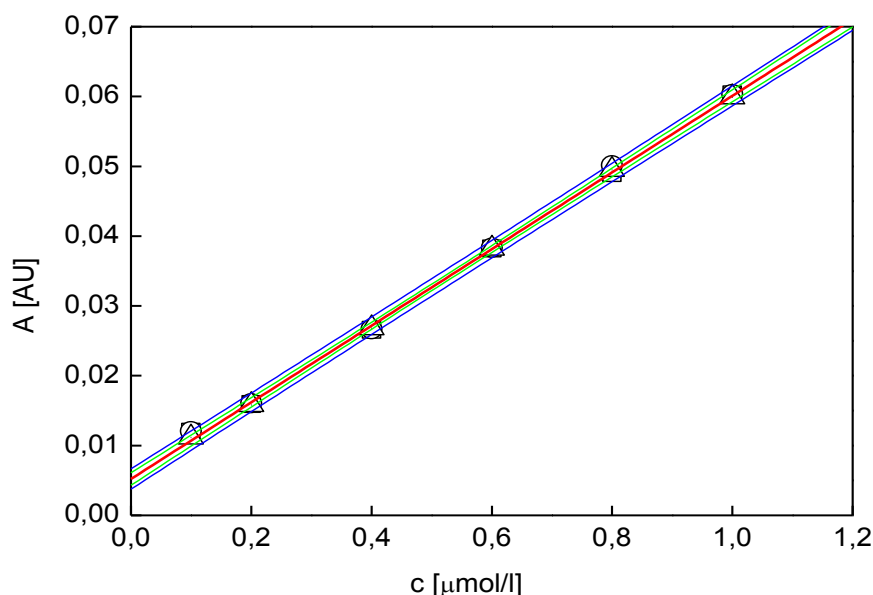
Obr. 27 Absorpční spektrum 2-AFN v methanolu v 1,0 cm křemenné kyvetě proti methanolu v koncentračním rozmezí 2×10^{-6} až 1×10^{-5} mol dm⁻³. Koncentrace 2-AFN (mol dm⁻³): 2×10^{-6} (1); 4×10^{-6} (2); 6×10^{-6} (3); 8×10^{-6} (4); 1×10^{-5} (5).



Obr. 28 Závislost absorbance na koncentraci 2-AFN v methanolu v koncentračním rozmezí 2×10^{-6} až 1×10^{-5} mol dm $^{-3}$ v 1,0 cm křemenné kyvetě proti methanolu. Predikční (modré křivky) a konfidenční pásy (zelené křivky) jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.



Obr. 29 Absorpční spektrum 2-AFN v methanolu v 1,0 cm křemenné kyvetě proti methanolu v koncentračním rozmezí 1×10^{-7} až 1×10^{-6} mol dm $^{-3}$. Koncentrace 2-AFN (mol dm $^{-3}$): 1×10^{-7} (1); 2×10^{-7} (2); 4×10^{-7} (3); 6×10^{-7} (4); 8×10^{-7} (5); 1×10^{-6} (6).



Obr. 30 Závislost absorbance na koncentraci 2-AFN v methanolu v koncentračním rozmezí 1×10^{-7} až 1×10^{-6} mol dm⁻³ v 1,0 cm křemenné kyvetě proti methanolu. Predikční (modré křivky) a konfidenční pásy (zelené křivky) jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabulka 9

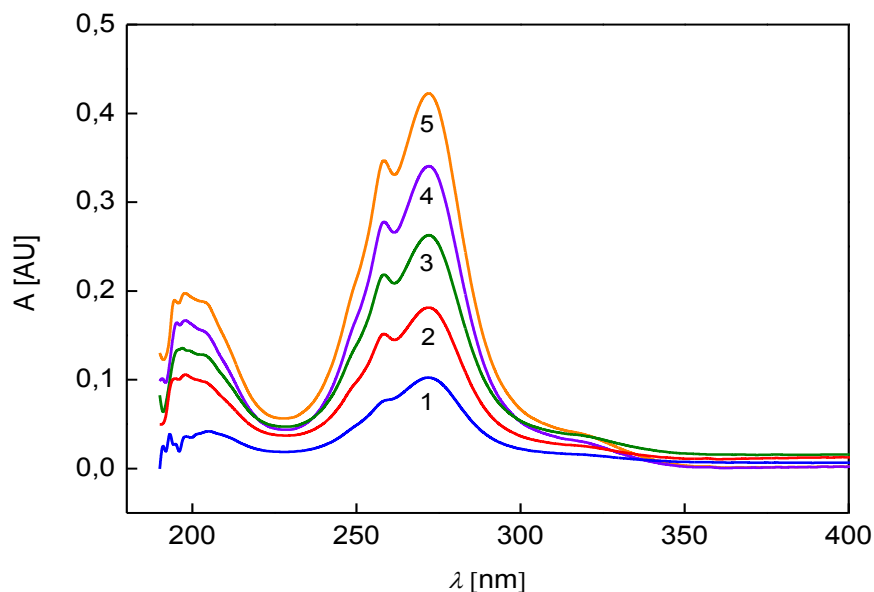
Parametry kalibračních přímek pro UV-VIS spektrofotometrické stanovení 2-AFN v methanolu měřené v 1,0 cm křemenné kyvetě proti methanolu.

Koncentrační rozmezí [mol dm ⁻³]	Směrnice [AU mmol dm ⁻³]	Úsek [AU]	R ²	L _Q [mol dm ⁻³]
2×10^{-6} až 1×10^{-5}	$47,6 \pm 1,5$	$0,0041 \pm 0,0096$	0,9963	–
1×10^{-7} až 1×10^{-6}	$54,88 \pm 0,53$	$0,00521 \pm 0,00032$	0,9995	1×10^{-7}

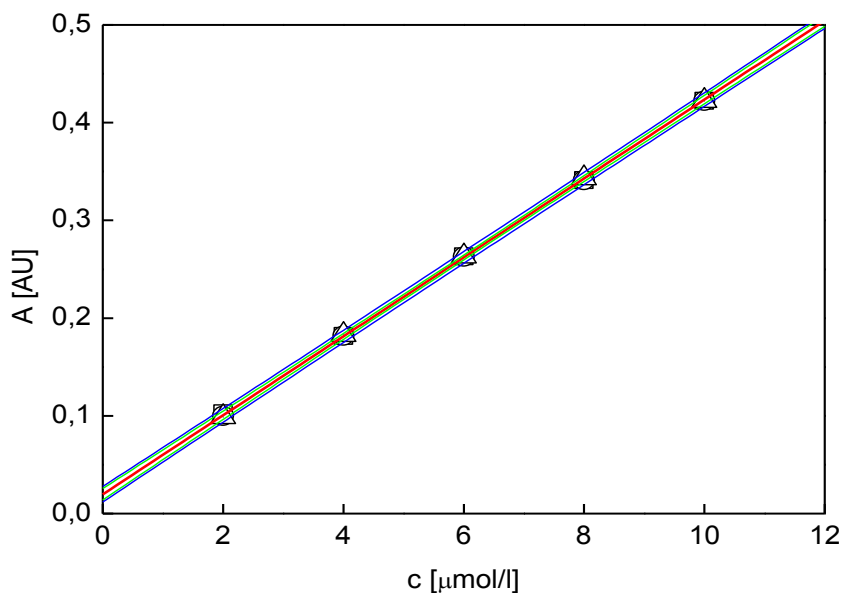
4.2 Koncentrační závislost v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1)

Závislost absorbance na koncentraci 2-AFN byla rovněž sledována i v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1). 2-AFN v prostředí BR pufru o pH 4,0 poskytuje v oblasti od 190 až 1000 nm jeden dobře vyvinutý pík, který je při vyšších koncentracích rozdělen na jeden dvojpík. Absorpční maximum je při vlnové délce 272 nm. Koncentrační závislost v rozmezí 2×10^{-5} až 1×10^{-4} mol dm⁻³ nebyla rovněž v 1,0 cm kyvetě změřena ze stejných důvodů jako v kapitole 4.1. V 1,0 cm kyvetě bylo měřeno koncentrační rozmezí 2×10^{-6} až 1×10^{-5} mol dm⁻³ (viz obr. 31) a kalibrační závislost (viz obr. 32) a koncentrační rozmezí 1×10^{-7} až

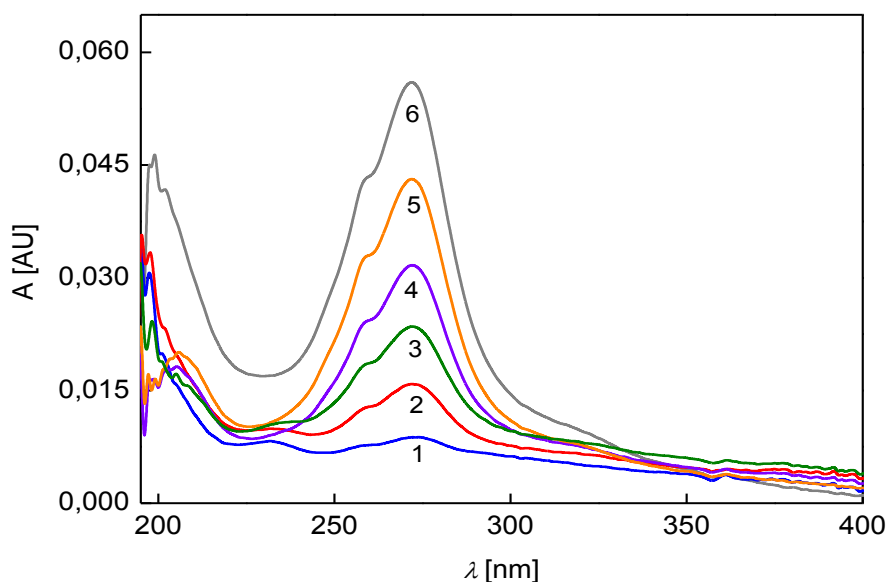
$1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (viz obr. 33) a kalibrační závislost (viz obr. 34). Parametry kalibračních přímek pro UV-VIS spektrofotometrické stanovení 2-AFN v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1) jsou uvedeny v tabulce 10.



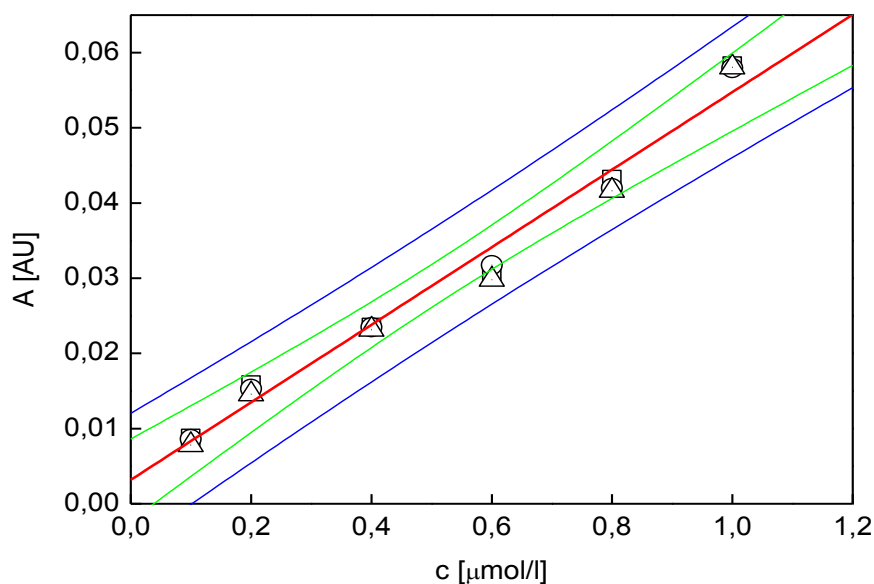
Obr. 31 Absorpční spektrum roztoku 2-AFN v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1) v 1,0 cm křemenné kyvetě proti methanolu a BR pufru v poměru 1:9 v koncentračním rozmezí 2×10^{-6} až $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Koncentrace 2-AFN (mol dm^{-3}): 2×10^{-6} (1); 4×10^{-6} (2); 6×10^{-6} (3); 8×10^{-6} (4); 1×10^{-5} (5).



Obr. 32 Závislost absorbance na koncentraci 2-AFN v koncentračním rozmezí 2×10^{-6} až $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ v 1,0 cm křemenné kyvetě v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1) proti methanolu a BR pufru v poměru 1:9. Predikční (modré křivky) a konfidenční pásy (zelené křivky) jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.



Obr. 33 Absorpční spektrum roztoku 2-AFN v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1) v 1,0 cm křemenné kyvetě proti methanolu a BR pufru v poměru 1:9 v koncentračním rozmezí 1×10^{-7} až 1×10^{-6} mol dm⁻³. Koncentrace 2-AFN (mol dm⁻³): 1×10^{-7} (1); 2×10^{-7} (2); 4×10^{-7} (3); 6×10^{-7} (4); 8×10^{-7} (5); 1×10^{-6} (6).



Obr. 34 Závislost absorbance na koncentraci 2-AFN v koncentračním rozmezí 1×10^{-7} až 1×10^{-6} mol dm⁻³ v 1,0 cm křemenné kyvetě v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1) proti methanolu a BR pufru v poměru 1:9. Predikční (modré křivky) a konfidenční pásy (zelené křivky) jsou sestrojeny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Tabulka 10

Parametry kalibračních přímek pro UV-VIS spektrofotometrické stanovení 2-AFN v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1) měřené v 1,0 cm křemenné kyvetě proti methanolu a BR pufru v poměru 1:9.

Koncentrační rozmezí [mol dm ⁻³]	Směrnice [AU mmol dm ⁻³]	Úsek [AU]	R ²	L _Q [mol dm ⁻³]
2×10 ⁻⁶ až 1×10 ⁻⁵	40,4 ± 0,27	0,0198 ± 0,0018	0,9998	–
1×10 ⁻⁷ až 1×10 ⁻⁶	51,9 ± 3,2	0,0032 ± 0,0020	0,9807	1×10 ⁻⁷

5. Závěr

Optimální podmínky pro polarografické stanovení 2-amino-9-fluorenonu (2-AFN) byly nalezeny ve vodně-methanolickém prostředí pufrovaném Brittonovým-Robinsonovým pufrům (BR pufr) pomocí technik DC tast polarografie (DCTP) a diferenční pulsní polarografie (DPP) na rtuťové kapající elektrodě (DME). Jako optimální prostředí pro měření koncentračních závislostí bylo vybráno prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1) pro obě polarografické metody. Pomocí DCTP na DME bylo proměřeno koncentrační rozmezí 1×10^{-6} až 1×10^{-4} mol dm⁻³ a metodou DPP na DME 1×10^{-7} až 1×10^{-4} mol dm⁻³.

Spektrofotometrické stanovení 2-AFN UV-VIS metodou bylo provedeno za účelem srovnání s nově vypracovanými polarografickými metodami stanovení 2-AFN. UV-VIS spektrofotometrické stanovení 2-AFN bylo provedeno jednak v čistém methanolu (při vlnové délce absorpčního maxima 274 nm) a také v optimálním prostředí pro polarografická stanovení, tj. v prostředí BR pufr o pH 4,0 – methanol (9:1), při vlnové délce absorpčního maxima 272 nm.

Porovnání mezi stanovitelností polarografických a spektrofotometrických stanovení 2-AFN jsou shrnuta v tabulce 11.

Tabulka 11

Porovnání mezi stanovitelností polarografických a spektrofotometrických stanovení 2-AFN.

metoda	koncentrační rozmezí [mol dm ⁻³]	prostředí	L_Q [mol dm ⁻³]
DCTP	1×10^{-6} až 1×10^{-4}	BR pufr pH 4,0 –methanol (9:1)	5×10^{-7}
DPP	1×10^{-7} až 1×10^{-4}	BR pufr pH 4,0 –methanol (9:1)	1×10^{-7}
UV-VIS	1×10^{-7} až 1×10^{-5}	methanol	1×10^{-7}
UV-VIS	1×10^{-7} až 1×10^{-5}	BR pufr pH 4,0 –methanol (9:1)	1×10^{-7}

Z uvedených výsledků vyplývá, že L_Q dosažené pomocí nově vyvinutých polarografických metod stanovení 2-AFN jsou srovnatelné s L_Q dosaženými pomocí UV-VIS spektrofotometrie. DPP na DME lze tedy výhodně použít jakožto alternativní analytickou metodu k UV-VIS spektrofotometrickému stanovení 2-AFN.

6. Literatura

1. *Bezpečnostní list (revize 30.08.2009, verze 3.0)*. Sigma – Aldrich, Praha 2009. Dostupné z URL: <http://www.sigmaaldrich.com>, staženo 31.3.2010.
2. *2-Amino-9-fluorenone*. Dostupné z URL: <http://www.chemicaland21.com/specialtychem/NH/2-AMINO-9-FLUORENONE.htm>, staženo 3.4.2010.
3. Holoubek, I.: *Polycyklické aromatické uhlovodíky v prostředí*. Český ekologický ústav, Praha 1996.
4. Lundstedt, S.; Persson, Y.; Öberg, L.: Transformation of PAHs During Ethanol-Fenton Treatment of an Aged Gasworks' Soil. *Chemosphere* **65**, 1288-1294 (2006).
5. Červinka, O.; Dědek, V.: *Organická chemie*. SNTL, Praha 1969.
6. Crisp, G.T.; Williamson, N.M.: Separation of Polyaromatic Hydrocarbons Using 2-Dimensional Thin-Layer Chromatography. *J. Chem. Educ.* **76**, 1691-1692 (1999).
7. *9-Fluorenone*. Dostupné z URL: <http://chemicaland21.com/specialtychem/finechem/9-fluorenone.htm>, staženo 3.4.2010.
8. Stocksdales, M.G.; Fletcher, S.E.; Henry, I.; Ogren, P.J. : Developing Investigation Skills in an Introductory Multistep Synthesis Using Fluorene Oxidation and Reduction. *J. Chem. Educ.* **81**, 388-390 (2004).
9. Doric, L.; Bagley, S.; Leddy, D.; Johnson, J.: Characterization of Mutagenic Subfractions of Diesel Exhaust Modified by Ceramic Particulate Traps. *Environ. Sci. Technol.* **21**, 757-785 (1987).
10. Muthu Vijayan Enoch, I.V.; Swaminathan, M.: Fluorimetric Study on Molecular Recognition of β -Cyclodextrin with 2-Amino-9-fluorenone. *J. Fluoresc.* **16**, 501-510 (2006).
11. Edler, B.; Zwiener, C.; Frimmel, F.H.: Particle Beam LC/MS Screening of Polar Compounds of Contaminated Ground Water Samples from a Former Gas Plant. *Fresenius J Anal. Chem.* **359**, 288-292 (1997).
12. Dollinger, M.D.; Hixon, S.C.; Sarraf, A.M.; White, W.: Mutations and Cell Transformation with 2-Azido-9-fluorenone Oxime. *In Vitro-Journal of the Tissue Culture Association* **16**, 541-546 (1980).
13. Brian, I.: Pleiotropic Drug Resistance in Hepatocytes Induced by Carcinogens Administered to Rats. *Cancer Res.* **47**, 5577-5583 (1987).
14. Frank, D.; Kirsch, P. ; Kirsch, W.: Synthesis of Potential Anticancer Agents. V. Schiff Bases and Related Compounds. *J. Org. Chem.*, **26**, 3858-3860 (1961).
15. Francis, K.; Grushka, E.: High Performance Liquid Chromatography with Metal-Solute Complexes. *Anal. Chem.* **50**, 1347-1353 (1978).

16. Ashworth, M.: The Study of a Double-Wave on the Polarographic Curves of Certain Aromatic Ketones and Aldehydes. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **13**, 229-251 (1948).
17. Day, R.A.; Milliken, S.R.; Shults, W.D.: Some Studies of the Polarography of Aromatic Ketones. *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2741-2744 (1952).
18. Day, R.A.; Kirkland, J.J.: Polarography of Fluorenone, Anthrone and Benzophenone. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 2766-2767 (1950).
19. Gary, J.T.; Day Jr, R.A.: Polarography of Some Aromatic Nitro and Carbonyl Compounds. *J. Electrochem. Soc.* **107**, 616-618 (1960).
20. Barek, J.; Opekar, F.; Štulík, K.: *Elektroanalytická chemie*. Karolinum, Praha 2005.
21. Štulík, K.; Barek, J.: *Elektrochemické analytické metody*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1984.
22. Barek, J.; Pecková, K.; Vyskočil, V.: *Chem. Listy* **103**, 889 (2009).
23. Matthias, O.: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry. *Chemometrics*, 194, Wiley-VCH, Weinheim 2007
24. Harvey, D.: Modern Analytical Chemistry, 96 , McGraw-Hill, Toronto 2000.
25. Powers, R.M.; Day, R.A.: Polarographic Reduction of Some Aromatic Aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 808-811 (1958).
26. Vyskočil, V.; Polášková, P.; Bologa, P.; Barek, J.: Polarographic and Voltammetric Determination of Genotoxic 9-Fluorenone Using Mercury and Silver Solid Amalgam Electrodes. *Sensing in Electroanalysis. 4 (str. 91), Pardubice, ISBN, 2009.*